

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA ASOCIADA A LOS BIOTIPOS DE *Spodoptera frugiperda* SMITH (Lepidoptera: Noctuidae)**

**Sandra María Marulanda Moreno**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2022



# **CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA ASOCIADA A LOS BIOTIPOS DE *Spodoptera frugiperda* SMITH (Lepidoptera: Noctuidae)**

**Sandra María Marulanda Moreno**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título  
de:

**Magister en Ciencias - Biotecnología**

Director (a):

(Ph.D.) Claudia Ximena Moreno Herrera

Codirector (a):

(Ph.D.) Gloria E. Cadavid Restrepo

Asesora:

(Ph.D.) Clara Inés Saldamando Benjumea

Línea de Investigación:

Ecología Microbiana

Grupo de Investigación:

Microbiodiversidad y Bioprospección

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2022



*A mi hija, por pintar mi vida color Violetta...*

*A Dairo: mi compañero, mi apoyo y complemento*

## Declaración de obra original

Yo, Sandra María Marulanda Moreno declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



---

Nombre: Sandra María Marulanda Moreno

Fecha: 7/05/2022

## **Agradecimientos**

En primera instancia quiero agradecer a mis tutoras y asesoras, las Doctoras Claudia Ximena Moreno Herrera, Gloria Ester Cadavid Restrepo y Clara Inés Saldamando Benjumea quienes confiaron en mí durante este proceso y con sus conocimientos y enseñanzas me guiaron durante todo el desarrollo del proyecto. Son para mí docentes ejemplares con altas cualidades humanas a quienes les debo valiosas enseñanzas para mi vida profesional y personal.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de La Universidad Nacional de Colombia, especialmente a Don Wilson Guerrero por el apoyo en muchos procesos. A mis compañeras Yuliana y Daniela por estar dispuestas a respaldarme en momentos coyunturales. A los compañeros de los grupos Microbiop, Biología Vegetal y Biotecnología Animal, quienes durante la pandemia fueron claves para darle continuidad a los procesos en el laboratorio. Al Dr. Rafael José Vivero, por brindarme su conocimiento y experiencia en los análisis bioinformáticos.

A MinCiencias, entidad que financió la investigación y el apoyo a estudiantes de maestría para el proyecto (Código QUIPU: 2020100134).

Quiero agradecer también a mis padres y hermanos por todas las experiencias y jornadas que hemos atravesado, las cuales me han llevado a edificarme como persona.

Finalmente le quiero dar las gracias a la infinita Fuerza Universal que hace posible toda existencia, y que nos da la voluntad para superar los obstáculos y continuar avanzando en este plano.

# Resumen

## Caracterización de la microbiota asociada a los biotipos de *Spodoptera frugiperda* SMITH (Lepidoptera: Noctuidae)

*Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), también conocida como gusano cogollero (FAW), es una plaga polífaga que causa importantes pérdidas económicas en una amplia variedad de cultivos. Presenta dos biotipos (maíz y arroz) que están genéticamente diferenciados, tienen aislamiento reproductivo y difieren en su resistencia a las toxinas de Bt e insecticidas. El microbioma asociado a FAW podría desempeñar un papel relevante en su éxito evolutivo y adaptativo. La información relacionada con el microbioma de FAW es limitada y se desconocen las diferencias en la estructura de las comunidades bacterianas según el biotipo y a lo largo de su ciclo de vida. En este trabajo, se llevó a cabo la caracterización de la microbiota asociada a los biotipos arroz (RS) y maíz (CS) de FAW durante las diferentes fases de su desarrollo. Para ello se colectaron larvas de FAW de cultivos de arroz y maíz. Se realizó la genotipificación de los insectos mediante los marcadores moleculares COI y FR. Se obtuvieron muestras de tejidos intestinales de adultos (machos y hembras) y de larvas (jóvenes y tardías). También se estudió la microbiota presente en huevos y pupas del insecto. A través de secuenciación de alto rendimiento del gen bacteriano 16S ARNr por la tecnología Illumina MySeq, se logró determinar que Firmicutes y Proteobacteria fueron los phyla dominantes durante la metamorfosis del insecto en CS y RS. La mayor riqueza observada de ASV (Amplicon Sequence Variants) se encontró en muestras de huevos. Los géneros *Illeobacterium*, *Ralstonia* y *Burkholderia* mostraron abundancias relativas similares en machos adultos y huevos. El género *Carnobacterium* tuvo una abundancia significativa en el estado de pupa en RS y CS. *Enterococcus* fue el género predominante en todas las muestras. El análisis de PCoA basado en el análisis de disimilitud de Bray-Curtis indicó que no había diferencias significativas entre las comunidades bacterianas de CS y RS. Sin embargo, se observó que la composición de los ASV difería significativamente entre muestras de diferentes etapas del ciclo de desarrollo del insecto. El análisis discriminante lineal (LDA) reveló una abundancia diferencial significativa para ocho géneros de bacterias entre muestras de cepas de arroz y maíz. Los géneros *Klebsiella*, *Dermacoccus*, A2 (familia Lachnospiraceae), *Lachnoclostridium*, *Faecalibaculum* y *Leuconostoc* fueron identificados como los taxones más predominantes en RS, mientras que *Arsenophonus* y *Weissella*



tuvieron una abundancia significativa CS. Los endosimbiontes *Arsenophonus* y *Spiroplasma* presentaron una correlación positiva entre CS y RS respectivamente. Se logró establecer un núcleo microbiano a nivel de género conformado por *Enterococcus* e *Ileobacterium*. Se aislaron y caracterizaron 37 aislamientos bacterianos mediante secuenciación del ADNr 16S, encontrándose que la bacteria predominante en todos los tejidos correspondía a la especie *Enterococcus mundtii*. Se identificaron otras bacterias de los géneros *Enterobacter*, *Leclercia*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Curtobacterium*, *Paenibacillus* y *Staphylococcus*. Los resultados de este trabajo son relevantes para entender el papel que desempeñan los simbiontes microbianos en FAW. Los endosimbiontes *Spiroplasma* y *Arsenophonus* asociados con los biotipos arroz y maíz, podrían tener una potencial aplicación en el biocontrol de este insecto plaga.

**Palabras clave:** *Spodoptera frugiperda*, biotipo maíz, biotipo arroz, microbiota, NGS, ciclo de vida

# Abstract

## Characterization of *Spodoptera frugiperda* SMITH (Lepidoptera: Noctuidae) strains associated microbiota

*Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), also known as Fall Army Worm (FAW), is a polyphagous pest that causes significant economic losses in a wide variety of crops. It has two strains (corn and rice) that are genetically differentiated, have reproductive isolation, and differ in their resistance to Bt toxins and insecticides. The microbiome associated with FAW could play a relevant role in its evolutionary and adaptive success. Information related to the microbiome of FAW is limited and differences in bacterial community structure according to strains and throughout their life cycle are unknown. In this work, we characterize the corn strain (CS) and rice strain (RS) associated microbiota of FAW during the different stages of their life cycle. For this purpose, FAW larvae were collected from rice and corn crops. The insects were genotyped using the molecular markers COI and FR. Intestinal tissue samples were obtained from adults (males and females) and larvae (young and late). The microbiota present in eggs and pupae of the insect was also studied. Through high-throughput sequencing of the bacterial 16S rRNA gene by Illumina MySeq technology, it was determined that Firmicutes and Proteobacteria were the dominant phyla during the metamorphosis of the insect in CS and RS. The highest observed richness of ASV (Amplicon Sequence Variants) was found in egg samples. *Illeobacterium*, *Ralstonia* and *Burkholderia* genera showed similar relative abundances in adult males and eggs. *Carnobacterium* genus had significant abundance in the pupal stage in RS and CS. *Enterococcus* was the predominant genus in all samples. PCoA analysis based on Bray-Curtis dissimilarity analysis indicated that there were no significant differences between the bacterial communities of CS and RS. However, the composition of ASVs was observed to differ significantly between samples from different stages of the insect development cycle. Linear discriminant analysis (LDA) combined with effect size measures (LEfSe) revealed significant differential abundance for 8 bacterial genera between rice and maize strain samples. *Klebsiella*, *Dermacoccus*, A2 (Lachnospiraceae family), *Lachnoclostridium*, *Faecalibaculum* and *Leuconostoc* genera were identified as the most predominant taxa in RS, while *Arsenophonus* and *Weissella* had significant abundance in CS. A positive correlation was found between *Arsenophonus* and CS and a positive correlation between

*Spiroplasma* and RS. A microbial core was established at the genus level consisting of *Enterococcus* and *Ileobacterium*. Additionally, 87 bacterial isolates were obtained in pure cultures, 37 of which were characterized by 16S rDNA sequencing. It was found that the predominant bacterium in all tissues corresponded to the species *Enterococcus mundtii*, the genetic affiliation at the species level was confirmed through sequencing of the *gyrB* gene. *Enterobacter*, *Leclercia*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Curtobacterium*, *Paenibacillus* and *Staphylococcus* genera were also identified. These results are relevant for the understanding of the role of microbial symbionts in FAW and for the development of new strategies for the control of insect pests.

*Spiroplasma* and *Arsenophonus* endosymbionts associated with rice and corn strains could have a potential application in the biocontrol of this insect pest.

**Keywords:** *Spodoptera frugiperda*, Corn strain, Rice strain, microbiota, NGS, Life cycle

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>8</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>6</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>7</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Marco Teórico</b> .....	<b>4</b>
1.1 <i>Spodoptera frugiperda</i> como plaga .....	4
1.1.1 Taxonomía y características biológicas .....	4
1.1.2 Origen y distribución .....	6
1.1.4 Biotipos de <i>S. frugiperda</i> .....	9
1.1.5 Estrategias de control .....	11
1.1.6 La microbiota asociada a insectos .....	14
1.1.7 El tracto gastrointestinal de lepidópteros como hábitat microbiano .....	15
1.1.8 La microbiota en <i>Spodoptera</i> .....	17
<b>2. Hipótesis</b> .....	<b>21</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>22</b>
3.1 Objetivo general .....	22
3.2 Objetivos específicos .....	22
<b>4. Materiales y Métodos</b> .....	<b>23</b>
4.1 Captura y cría de insectos .....	23
4.2 Obtención de tejidos .....	24
4.3 Identificación de los biotipos de <i>S. frugiperda</i> .....	25
4.3.1 Amplificación de la región Citocromo Oxidasa I por PCR .....	25
4.3.2 PCR de la región nuclear FR .....	26
4.4 Técnicas dependientes de cultivo .....	26
4.4.1 Recuento y aislamiento de bacterias .....	26
4.4.2 Selección de bacterias mediante Análisis del Espaciador Interno Transcrito (ITS) .....	27
4.4.3 Clasificación taxonómica de aislados bacterianos utilizando secuenciación de los genes ARNr 16S y <i>gyrB</i> .....	28
4.5 Ensayos independientes de cultivo .....	29
4.5.1 Obtención de ADN total de tejidos de <i>S. frugiperda</i> .....	29

4.5.2	Análisis de las comunidades bacterianas por secuenciación masiva de nueva generación (NGS).....	29
<b>5.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>32</b>
5.1	Identificación de los biotipos maíz y arroz de <i>S. frugiperda</i> .....	32
5.2	Diversidad bacteriana mediante ensayos dependientes de cultivo .....	33
5.2.1	Recuento e identificación morfológica .....	33
5.2.2	Caracterización taxonómica de los aislados bacterianos.....	38
5.3	Análisis de las comunidades microbianas mediante Secuenciación masiva de Nueva Generación- NGS .....	43
5.3.1	Diversidad de las comunidades bacterianas en <i>S. frugiperda</i> biotipos arroz y maíz .....	44
5.3.2	Composición del microbioma bacteriano asociado a los biotipos de <i>S. frugiperda</i> .....	47
<b>6.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>58</b>
6.1	Comunidades bacterianas asociadas a los biotipos de <i>S. frugiperda</i> .....	58
6.2	Dinámica de las comunidades microbianas durante el ciclo de vida de <i>S. frugiperda</i> .....	61
6.3	Comunidades bacterianas de <i>S. frugiperda</i> encontradas por el enfoque dependiente de cultivo y contraste con los hallazgos obtenidos por NGS .....	65
<b>7.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>70</b>
	<b>Anexos .....</b>	<b>72</b>
	<b>A. Anexo: Dieta para cría de larvas de Noctuidae de Shorey y Hale (1965) modificada para el estudio de microbioma de <i>S. frugiperda</i> .....</b>	<b>72</b>
	<b>B. Anexo: Estudio de la anatomía del tracto digestivo en larvas y adultos de <i>S. frugiperda</i> .....</b>	<b>73</b>
<b>8.</b>	<b>Anexo: Resultados .....</b>	<b>76</b>
<b>8.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>85</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1-1.</b> Ciclo de vida de <i>S. frugiperda</i> .....	5
<b>Figura 1-2</b> Daños de <i>S. frugiperda</i> en la planta de maíz. Fuente propia.....	8
<b>Figura 1-3.</b> Detalle del tracto gastrointestinal completo de larvas de <i>S. frugiperda</i> .....	15
<b>Figura 4-1.</b> Localización sitios de muestreo. ....	23
<b>Figura 5-1.</b> Identificación de biotipos maíz y arroz por PCR-RFLP de la región COI y PCR de la región FR. ....	32
<b>Figura 5-2.</b> Comparación del conteo promedio de log UFC/g en tejidos de <i>S. frugiperda</i> según el biotipo y el estado de desarrollo .....	33
<b>Figura 5-3.</b> Dendrograma de inferencia bayesiana para secuencias parciales del ADNr 16S de bacterias de <i>S. frugiperda</i> .....	41
<b>Figura 5-4.</b> Dendrograma de inferencia bayesiana para secuencias parciales del gen <i>gyrB</i> de bacterias de <i>S. frugiperda</i> .....	42
<b>Figura 5-5.</b> Curvas de rarefacción .....	43
<b>Figura 5-6.</b> Medidas de diversidad alfa (intra-diversidad) de la composición bacteriana usando ASVs en diferentes fases de desarrollo de dos biotipos de <i>S. frugiperda</i> en Colombia. ....	45
<b>Figura 5-7.</b> Análisis de $\beta$ - diversidad de las comunidades bacterianas asociadas con los grupos de muestras de <i>S. frugiperda</i> .....	46
<b>Figura 5-8.</b> Dendrograma a nivel de género de muestras de diferentes fases de desarrollo de <i>S. frugiperda</i> biotipos maíz y arroz. ....	47
<b>Figura 5-9.</b> Composición y diversidad de la microbiota bacteriana de varias fases de desarrollo de <i>S. frugiperda</i> de acuerdo con el biotipo. ....	49
<b>Figura 5-10.</b> Abundancia relativa de <i>Spiroplasma</i> en muestras de diferentes fases de desarrollo de <i>S. frugiperda</i> . ....	50
<b>Figura 5-11.</b> Análisis de agrupamiento jerárquico de ASVs a nivel de género en muestras de diferentes fases de desarrollo de <i>S. frugiperda</i> biotipos arroz y maíz .....	51
<b>Figura 5-12.</b> Análisis lineal discriminante (LDA) tamaño del efecto (LEfSe) de la microbiota bacteriana de <i>S. frugiperda</i> . ....	52
<b>Figura 5-13.</b> Abundancia relativa de tres géneros de bacterias en los biotipos maíz y arroz de <i>S. frugiperda</i> en Colombia.. ....	54
<b>Figura 5-14.</b> Análisis de correlación de patrones de bacterias de <i>S. frugiperda</i> a nivel de género.. ....	55
<b>Figura 5-15.</b> Análisis de Core microbiano de ASVs de muestras de <i>S. frugiperda</i> .....	56
<b>Figura 6-1.</b> Dinámica de las comunidades bacterianas a nivel de género de <i>S. frugiperda</i> durante varias fases de su desarrollo. ....	65

# Lista de tablas

<b>Tabla 4-1.</b> Muestras de ADN total analizadas por secuenciación masiva (NGS).....	30
<b>Tabla 5-1.</b> Características macroscópicas y microscópicas de aislados bacterianos seleccionados .....	34
<b>Tabla 5-2.</b> Identificación de aislados bacterianos de dos biotipos de <i>S. frugiperda</i> de acuerdo con su similitud con secuencias del ADNr 16S. ....	39
<b>Tabla 5-3.</b> Composición del núcleo microbiano de <i>S. frugiperda</i> biotipos maíz (CS) y arroz (RS) basado en de ASVs con bundancia relativa mayor a 0.01%, y un umbral de prevalencia mayor al 30%. NA: no asignado. ....	57

# Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
ADNr	Ácido Desoxiribonucleico ribosomal
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ASV	Variantes de Secuencias de Amplicones
NGS	Secuenciación de nueva generación
NCBI	National Center of Biotechnology Information
BLAST	Basic Local Alignment Tool
PCoA	Análisis de Coordenadas Principales
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
ANOVA	Análisis de Varianza
LDA	Análisis lineal discriminante
LEfSe	Medición del tamaño del efecto
CS	Biotipo maíz
RS	Biotipo arroz
COI	Citocromo Oxidasa I
FR	Gen nuclear FR (For Rice)
<i>gyrB</i>	Gen girasa Beta



# Introducción

Los lepidópteros con más de 160.000 especies descritas en 47 superfamilias, integran uno de los taxones de insectos más diversos y ampliamente diseminados del planeta (Krenn, 2010) y dentro de los que se encuentran las mayores plagas de importancia en la agricultura. En este grupo, *S. frugiperda* sobresale por ser una de las plagas más devastadoras que amenaza la productividad y sostenibilidad en diferentes cultivos en todo el mundo (Atnafu, Beyene, Zemedu, & Yitbarek, 2021; Chhetri & Acharya, 2019; Guo et al., 2020; Wang et al., 2020). La especie presenta la particularidad de estar constituida por dos razas o biotipos que poseen diferencias genéticas, fisiológicas, comportamentales y ecológicas; lo cual tiene implicaciones en la elección de los esquemas de manejo, dado que la respuesta de resistencia/susceptibilidad a las medidas de control empleadas varía de acuerdo con el biotipo del insecto (Adamczyk, Holloway, Leonard, & Graves, 1997; del Valle, Carrizo, Romero, Baigorí, & Pera, 2019; Ríos-Díez & Saldamando-Benjumea, 2011; Ríos-Díez, Siegfried, & Saldamando-Benjumea, 2012).

*S. frugiperda* es una especie endémica de las regiones tropicales y subtropicales del hemisferio occidental, en donde se reconoce como una de las plagas de mayor importancia en el cultivo del maíz. Puede además atacar más de 300 plantas hospedantes (Montezano et al., 2018), dentro de las cuales se encuentran cultivos de importancia económica como arroz, sorgo, caña de azúcar, algodón, maní, soya, alfalfa, entre otros. En América Latina se han reportado pérdidas entre el 15 y el 75% de la producción asociados al daño en plantas infectadas (Ayil-Gutiérrez et al., 2018). El estado larvario se alimenta del follaje y de las partes reproductivas de las plantas, conduciendo a un deterioro en el potencial de crecimiento y por consiguiente una alteración en la producción (Buntin, 1986).

En Colombia, este insecto actúa como plaga primaria afectando cultivos de maíz (Vargas-Méndez, Sanabria-Flórez, Saavedra-Reyes, Merchan-Arenas, & Kouznetsov, 2018); y como plaga secundaria en cultivos de arroz, caña de azúcar, sorgo, pasto y algunas hortalizas (García, Mosquera, Vargas, & Rojas, 2002).

En el año 2016 *S. frugiperda* fue reportada por primera vez como especie invasora en el continente africano (Goergen, Kumar, Sankung, Togola, & Tamò, 2016), en donde se diseminó rápidamente provocando daños de gran magnitud especialmente en maíz y de

menor proporción en sorgo y otros cultivos (Day et al., 2017; Goergen et al., 2016; Rodney Nagoshi et al., 2017). Actualmente se encuentra en India (Kalleshwaraswamy et al., 2018), Tailandia (IPPC, 2018), China (IPPC, 2019) y Australia (FAO, 2020).

Para reducir los daños ocasionados por *S. frugiperda*, se emplean plaguicidas como los organofosforados, carbamatos y piretroides, los cuales presentan alta toxicidad y no son selectivos, pudiendo afectar al ser humano y otros mamíferos, organismos acuáticos e insectos polinizadores (González-Maldonado, Gurrola-reyes, & Chaírez-Hernández, 2015; Morillo, 2001). Además, en Colombia cada biotipo muestra un comportamiento diferencial frente a los insecticidas (lambdacialotrina y metomil) y *Bacillus thuringiensis* (endotoxinas Cry1AC, Cry1AB), siendo el biotipo de arroz más tolerante a los insecticidas comparado con el biotipo de maíz (Ríos-Díez et al., 2012) y el biotipo de maíz más tolerante a las endotoxinas del *B. thuringiensis* (Ríos-Díez & Saldamando-Benjumea, 2011).

De acuerdo con lo anterior se evidencia la necesidad de explorar nuevas alternativas para el control de *S. frugiperda* que sean viables desde la perspectiva ambiental, y que puedan ejercer un control eficiente de cada biotipo del insecto.

En las últimas décadas, un creciente número de investigaciones se han enfocado en estudiar las comunidades microbianas que se asocian con los insectos, y se sabe que éstos son colonizados naturalmente por una amplia variedad de microorganismos con los cuales establecen complejas relaciones que juegan un papel crucial en su diversificación y éxito evolutivo (Frago, Dicke, & Godfray, 2012; Janson, Stireman, Singer, & Abbot, 2008; Su, Zhou, & Zhang, 2013). Por ejemplo, algunos géneros de bacterias intestinales están involucrados en los procesos de captación y disponibilidad de nutrientes (Douglas, 2009), en la modulación de la respuesta inmune promoviendo la susceptibilidad o resistencia del insecto frente a patógenos o parasitoides (Benjamino & Graf, 2016; Hendry, Hunter, & Baltrus, 2014), en la detoxificación de metabolitos producidos por las plantas en respuesta al ataque por herbívoros (Mason, Couture, & Raffa, 2014) y en la degradación de moléculas complejas como las empleadas en el control de plagas, generando resistencia en los insectos hospedantes (Kikuchi et al., 2012). Esta respuesta de resistencia podría estar influenciada por la presencia de la microbiota asociada al tracto gastrointestinal de las larvas de estos biotipos.

El estudio de la microbiota asociada a los insectos constituye, por lo tanto, un blanco de interés no solo para el entendimiento de las relaciones que establecen con sus hospedantes, sino además por el potencial que representan para el desarrollo de nuevas estrategias de control de los insectos plaga.

Los estudios relacionados con la microbiota intestinal de *S. frugiperda* son escasos y se limitan al estudio de simbioses presentes en estadios larvarios tardíos (Acevedo et al., 2017; Gichuhi et al., 2019; Higuera-Palacio et al., 2021; Jones, Mason, Felton, & Hoover, 2019; Oliveira, Rodrigues, & Cônsoli, 2021). Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar la microbiota presente en los biotipos del gusano cogollero durante distintas fases de su ciclo biológico. La microbiota de *S. frugiperda* podría desempeñar un importante papel en el gran éxito y adaptación de esta especie. Los resultados de este trabajo son relevantes para el entendimiento del papel que desempeñan los simbioses microbianos en *S. frugiperda* y para el desarrollo de nuevas estrategias para el control de insectos plaga.

# 1. Marco Teórico

## 1.1 *Spodoptera frugiperda* como plaga

### 1.1.1 Taxonomía y características biológicas

*Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) es un insecto lepidóptero de la familia Noctuidae (Todd & Poole, 1980) popularmente conocido como oruga militar tardía o gusano cogollero del maíz. Es un insecto holometábolo, presentando cuatro fases principales: huevo, larva u oruga, pupa y adulto Figura 1-1. Los adultos exhiben dimorfismo sexual; las hembras ovipositan sacos de huevos en la parte superior o en el envés de las hojas, éstos son de color crema o amarillo pálido y van tornándose marrón claro a medida que se aproxima la eclosión. Cada saco o postura está protegido por una capa de escamas de color gris-rosáceo proveniente del abdomen de la hembra, y puede contener entre 150 y 200 huevecillos de 0.5 mm de diámetro, aplanados en la base y en forma de domo. El periodo de eclosión oscila de dos a tres días dependiendo de las condiciones climáticas. Cada hembra puede ovipositar más de 1000 huevos durante su vida (FAO & CABI, 2019)

Las larvas comienzan a alimentarse desde el interior del huevo rompiendo el corion para emerger y consumiéndolo luego en su totalidad. En estadios tempranos presentan fototaxis positiva y se mueven hacia la parte superior de la planta desde donde pueden dispersarse a plantas adyacentes a través de la emisión de hilos de seda (Harrison et al., 2019). Las larvas pueden consumir las hojas, los tallos y las partes reproductivas de las plantas. Presentan comportamiento canibalista desde fases larvarias tempranas, por lo que normalmente se encuentran solo de una a tres larvas completamente desarrolladas por planta pese al gran número de larvas neonatas que emergen de cada saco de huevos (Chapman et al., 1999). Normalmente las larvas pasan por seis estadios o instares en los cuales cambian de color y aumentan de tamaño (Guzmán-Prada, Rodríguez-Chalarca, & Valencia-Cataño, 2016). La larva neonata presenta una cabeza más grande que el cuerpo y negra en su totalidad, se evidencian setas o vellosidades en todo su cuerpo. Durante el primer instar larvario pueden medir de 2 a 3 mm de longitud y a medida que avanza el desarrollo van aumentando de tamaño, su cabeza se vuelve más proporcionada con relación al cuerpo y las setas se aprecian cada vez menos. En el segundo instar miden entre 4 y 10 mm, los tubérculos en todo el cuerpo y las bandas antocianóticas en los

costados son más notorias. Para el tercer instar, las larvas adquieren una coloración más oscura por la aparición de líneas longitudinales de color rojizo en todo el cuerpo y una banda oscura en los costados (Guzmán, Rodríguez, & Valencia, 2016). Cuando la planta hospedante es el maíz, a partir de este estadio se introducen en el cogollo, haciendo perforaciones que son apreciadas cuando la hoja se abre o desenvuelve (Negrete-Barón & Morales-Angulo, 2003).

**Figura 1-1.** Ciclo de vida de *S. frugiperda*. Fuente propia.



Durante el cuarto instar, en la cabeza de la larva aparece completamente definida la sutura epicraneal o "Y" invertida y se demarcan anillos concéntricos en la zona mesotorácica. También aparecen tres líneas dorsales blancas y una línea lateral clara (Sharanabasappa, Kallelshwaraswamy, Maruthi, & Pavithra, 2018). En los dos últimos estadios de desarrollo, se acentúa la tonalidad marrón oscura en el cuerpo y las setas y segmentos abdominales se hacen menos visibles adquiriendo una tonalidad brillante (Guzmán et al., 2016). Las larvas pueden alcanzar hasta 4,5 cm en su último estadio (Rwomushana, 2019).

Durante el sexto estadio tardío, las larvas dejan de alimentarse por uno o dos días (prepupa) (Navasero & Navasero, 2020), se introducen en la tierra y se transforman en pupas. En esta fase suelen medir entre 14 y 17 mm y pasan de once a doce días hasta

convertirse en adultos (Rizzo & La Rossa, 1992). Las polillas son de coloración gris oscuro, las hembras son de mayor tamaño que los machos y de coloración parda con alas traseras de color blanco. Los machos presentan colores más llamativos con arabescos en las alas delanteras. Vuelan con facilidad y son activas desde el atardecer y durante la noche, siendo atraídas por la luz. Pueden desplazarse a varios kilómetros de distancia, especialmente cuando soplan vientos fuertes. Durante el día permanecen escondidas en la hojarasca o en otros sitios sombreados (Negrete-Barón & Morales-Angulo, 2003). Un adulto vive en promedio diez días, con un intervalo de 7 a 21 días (CABI, 2019). La duración del ciclo de vida completo varía en función de la temperatura, completándose en alrededor de 30 días durante el verano pudiendo extenderse hasta 90 días en temporadas de invierno en países estacionales (Capinera, 2002).

### **1.1.2 Origen y distribución**

*S. frugiperda* es originaria de regiones tropicales y subtropicales del hemisferio occidental distribuyéndose desde Estados Unidos hasta Argentina (Hruska, 2019; Tapa-Yotto et al., 2021). La especie no realiza diapausa en ninguna de las fases de su ciclo biológico (Capinera, 2002), no obstante; su notable capacidad de dispersión es una estrategia que le permite realizar migración (Johnson, 1987) y expandirse por distancias de hasta más de 2000 km (Navasero & Navasero, 2020; Nagoshi et al., 2017). El amplio espectro de especies vegetales tanto cultivadas como silvestres que puede atacar, la elevada tasa de fecundidad, la capacidad de adaptación a una variedad de condiciones ambientales sumado al crecimiento del comercio internacional; son condiciones que le han permitido a esta plaga expandirse desde su lugar de origen, pudiendo aparecer como especie invasora en varias regiones del mundo.

Hasta el año 2015 la plaga se encontraba como especie indígena confinada al continente americano (Guo et al., 2020; Li-zhong, Guo-hua, Yong-hong, Li, & Yun-dong, 2015) en donde es reconocida por el importante impacto económico sobre diversidad de cultivos. En el año 2016 fue reportada por primera vez en África (Goergen, Kumar, Sankung, Togola, & Tamò, 2016) y desde allí se ha diseminado experimentando una expansión significativa a lo largo de todo el continente, provocando daños de gran magnitud especialmente en maíz y de menor proporción en sorgo y otros cultivos (Goergen et al. 2016; Tindo et al. 2016; Day et al. 2017; Nagoshi et al. 2017, 2018). A la fecha ha sido

confirmada en 44 países africanos (Prasanna, Huesing, Eddy, & Peschke, 2018). A comienzos del año 2018 fue encontrada en la India (Kalleshwaraswamy et al., 2018) y luego en Tailandia (IPPC, 2018). Para el 2019 la plaga ya había alcanzado China (IPPC, 2019), Indonesia, Laos, Malasia, Vietnam, República de Corea y Japón. Recientemente, se detectó por primera vez en Australia, Mauritania y Timor-Leste (FAO, 2020).

### 1.1.3 Daño que ocasiona y pérdidas económicas

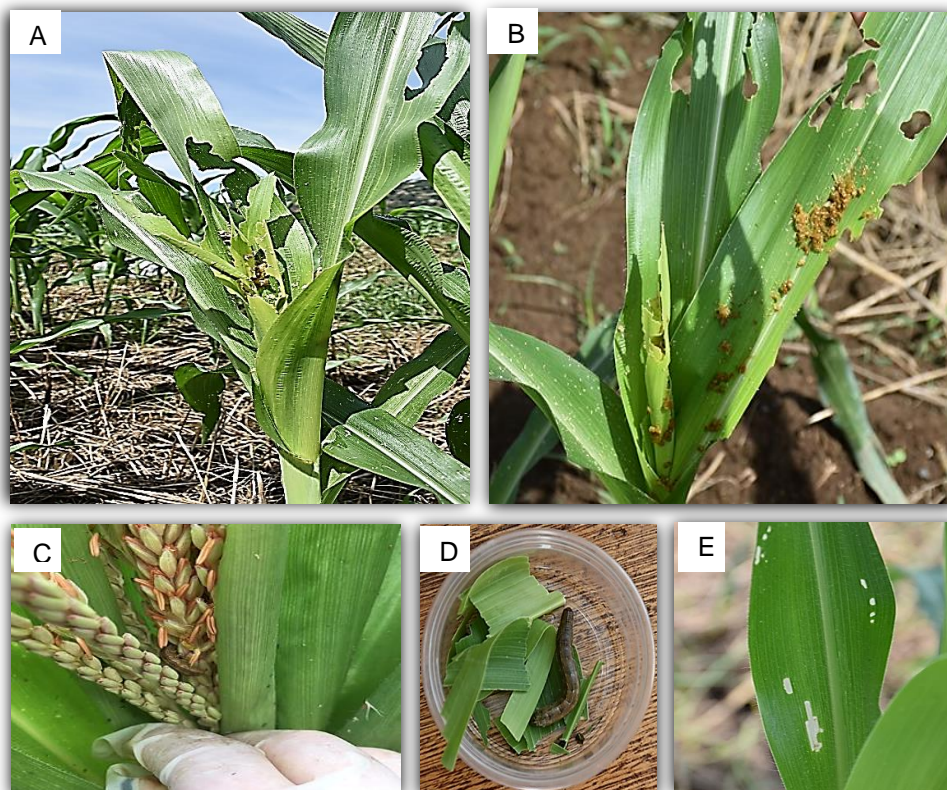
*S. frugiperda* es una especie altamente polífaga con una marcada predilección por las Poáceas (Casmuz et al., 2010) siendo los cultivos que más comúnmente ataca el maíz (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum* spp.) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). Un reciente reporte basado en una revisión de literatura y estudios adicionales en Brasil, de 76 familias de plantas, principalmente Poaceae (106), Asteraceae (31) y Fabaceae (31) indicó que esta plaga puede afectar alrededor de 353 especies de plantas hospederas (Montezano et al., 2018). Esta característica le facilita la supervivencia y persistencia en el ambiente.

La fase larvaria se alimenta de las estructuras vegetativas y reproductivas de las plantas. Las larvas jóvenes se alimentan de la parte superficial de las hojas, provocando una esqueletización en un patrón de “panel de ventana” (figura 1-2 E). Los estadios larvarios tardíos devoran vorazmente las hojas por el borde o forman agujeros alrededor de los cuales se encuentra abundante excremento similar a aserrín (FAO & CABI, 2019) (figura 1-2 B). En consecuencia, *S. frugiperda* puede provocar pérdidas directas en el rendimiento de las cosechas cuando la larva afecta partes maduras o en desarrollo de la planta que se cosecha como es el caso de las mazorcas o los granos. También puede llevar a pérdidas indirectas en el rendimiento al afectar el follaje y reducir el área fotosintética y como resultado reducir la producción (Overton et al., 2021). Además, la perforación de mazorcas y granos en plantas de maíz puede conducir a infección por hongos y contaminación por aflatoxinas afectando de esta manera la calidad del grano (Farias et al., 2014).

En Colombia, este insecto actúa como plaga primaria afectando cultivos de maíz (*Zea maíz*) y ocasionando una reducción de hasta un 35% en el rendimiento (Villamizar et al., 2012). Como plaga secundaria afecta cultivos de arroz, caña de azúcar, sorgo, algodón (*Gossypium hirsutum*), pasto y algunas hortalizas (García, Mosquera, Vargas, & Rojas,

2002). Cuando la plaga ataca plantaciones de maíz en fases tempranas puede ocasionar una reducción de hasta el 70% del rendimiento (Ayala, Navarro, & Virla, 2013; Hruska, 2019).

**Figura 1-2.** Daños de *S. frugiperda* en la planta de maíz. Fuente propia<sup>1</sup>



La disminución en el rendimiento trae como consecuencia un significativo impacto económico. En Brasil, para el año 2009 se estimaron gastos de \$600 millones de dólares en el control de *S. frugiperda*, con un equivalente de US \$40/ha (Ferreira, Alves, Gottardo, & Georgino, 2010). En África sub-sahariana se estima que las pérdidas económicas superan los \$US 13 billones de dólares por año considerando solo los cultivos de maíz, sorgo, arroz y caña de azúcar (Abrahams et al., 2017). La invasión de esta plaga y sus devastadores efectos ponen en riesgo la seguridad alimentaria del continente.

<sup>1</sup> Daño de *S. frugiperda* en plantaciones de maíz. **A y B:** Afectación del área foliar donde se observan agujeros y excremento en forma de aserrín. **C:** larva L5 atacando el cogollo. **D:** Larva colectada en contenedor. **E:** Daño en epidermis de la hoja en "panel de ventana" característico del ataque de larvas jóvenes sobre la planta.



### 1.1.4 Biotipos de *S. frugiperda*

Estudios en poblaciones de *S. frugiperda* han proporcionado evidencia de la existencia de dos linajes o biotipos que son indistinguibles morfológicamente en su fase larvaria, pero que difieren en ciertas características fisiológicas, comportamentales, ecológicas y genéticas: el biotipo maíz (CS) que afecta preferencialmente maíz, algodón y sorgo; y el biotipo arroz (RS) que se encuentra de forma predominante en arroz y pasturas (Nagoshi et al., 2006; Pashley, McMichael, & Silvain, 2004; Pashley, 1986; Pashley, McMichael, & Silvain, 2004). Dorothy Pashley identificó los biotipos por primera vez en 1986 cuando genotipificó usando aloenzimas poblaciones del insecto con un comportamiento alimenticio diferencial hacia el maíz y el arroz. Su trabajo reveló la asociación de alelos de determinadas esterasas de forma coincidente con las poblaciones relacionadas a cada planta, encontrando que las esterasas B, C y D tenían un predominio en poblaciones muestreadas en cultivos de maíz, mientras que las esterasas E y F presentaban una alta frecuencia en poblaciones de cultivos de arroz (Prowell, McMichael, & Silvain, 2004). La aparición de estas subpoblaciones del insecto parece ser el producto de un proceso de especiación simpátrica en curso (Drès & Mallet, 2002; Prowell, 1998; Unbehend, Hänniger, Meagher, Heckel, & Groot, 2013). Hasta la fecha no hay un consenso sobre la separación del insecto en especies diferentes o en biotipos dentro de una misma especie (Drès & Mallet, 2002; Dumas, Legeai, et al., 2015; Juárez et al., 2014). No obstante, diferentes investigaciones han mostrado que entre los biotipos se da aislamiento reproductivo precigótico y postcigótico (Groot et al., 2008; Pashley, Hammond, & Hardy, 1992; . Pashley & Martin, 1987).

La barrera precigótica ocurre antes de la fecundación, y consiste en diferencias entre las poblaciones que tienen que ver con hábitat, biología y comportamiento (Dumas, Legeai, et al., 2015). Para el caso de *S. frugiperda* se ha encontrado: a) Que existe aislamiento temporal, pues el biotipo maíz tiende a aparearse en los dos primeros tercios de la noche, mientras que el biotipo de arroz en el último tercio (Pashley et al., 1992). En Colombia, en un estudio realizado por Saldamando-Benjumea, Estrada-Piedrahíta, Velásquez-Vélez, & Bailey (2014) no se evidenció este tipo de temporalidad b) Se da aislamiento comportamental parcial, pues es raro el apareamiento de hembras del biotipo maíz con los machos del biotipo arroz, aunque el cruce recíproco si produce progenie (Pashley, 1998).

c) Se ha encontrado diferencia en la composición de feromonas entre los biotipos en poblaciones de Florida (US), en donde las hembras del biotipo de maíz presentan una concentración mayor de la feromona Z11-16:Ac (m) que las hembras de arroz, y menor concentración de las feromonas (Z9-14:Ac (M), 14:Ac (a), Z11-14:Ac (b), 12:Ac (c), Z9-12:Ac, Z7- 12:Ac (Groot et al., 2008). Se ha observado también que los machos prefieren las feromonas de hembras de su mismo biotipo en campo (Pashley et al., 1992). En concordancia con lo anterior, en Colombia Cañas-Hoyos, Lobo-Echeverri, & Saldamando-Benjumea, (2017) encontraron que los biotipos producen 21 compuestos volátiles, 11 de ellos exclusivos del biotipo de arroz y 8 del biotipo de maíz y los demás compuestos son compartidos. d) Ecológico: ya que cada biotipo presenta preferencia por ciertas plantas hospederas (maíz y arroz), las hembras podrían diferenciarse en su comportamiento de oviposición (Prowell et al., 2004; Vélez-Arango, Arango, Villanueva, Aguilera, & Saldamando, 2008).

Por otro lado, existe aislamiento postcigótico entre especies relacionadas, cuando la eficacia de los genotipos híbridos es más baja que la de los genotipos parentales (Dumas, Barbut, et al., 2015). Con relación a lo anterior, Velásquez-Vélez, Saldamando-Benjumea, & Ríos-Diez (2011), encontraron que en los biotipos de *S. frugiperda* del Tolima, había una viabilidad reducida en las hembras particularmente en la generación F1, y una baja fertilidad en las líneas F1 y F2 y baja eficacia. Así mismo, Dumas, Legeai, et al. (2015); encontraron una reducción significativa en el éxito de apareamiento en la generación F1 cuando se cruzaban individuos de los biotipos maíz con los de biotipo arroz.

El uso de parámetros morfológicos no es útil para la diferenciación de los biotipos de *S. frugiperda* en su fase larvaria, no obstante; Cañas-Hoyos, Márquez, & Saldamando-Benjumea (2014), demostraron a través de un análisis morfométrico, que existían diferencias significativas en la forma de las alas entre los adultos de los biotipos maíz y arroz en poblaciones mantenidas en el laboratorio.

Para la identificación precisa de los biotipos se pueden utilizar varios métodos que emplean marcadores moleculares mitocondriales (COI) o de los cromosomas sexuales (esterasa, FR y *Tpi*). La enzima Citocromo Oxidasa I ha sido un marcador usado con mucha frecuencia en estudios de poblaciones de *S. frugiperda* (Cano-Calle, Arango-Isaza, & Saldamando-Benjumea, 2015; Higuera Palacio et al., 2021; Levy, Garcia-Maruniak, &

Maruniak, 2002; Nagoshi et al., 2006) La técnica consiste en la amplificación por PCR de un fragmento de 569 pb del gen que codifica por la enzima COI, seguido del uso de enzimas de restricción. Cuando se usa la enzima de *MspI* (HpaII) se generan dos fragmentos, uno de 497 pb y otro de 72 pb sólo en el biotipo maíz (Levy et al., 2002; Rod Nagoshi & Meagher, 2004); pero si la enzima usada es *SacI*, se reconocerán dos sitios de clivaje para generar dos fragmentos, uno de 500 pb y otro de 69 pb sólo en el biotipo arroz (Nagoshi & Meagher, 2004). En contraste, la PCR de una región en tándem del ADN nuclear denominada FR (Found in Rice) produce amplificaciones de alto peso molecular (mayores a 500 pb) que pueden visualizarse en forma de escalera o de barrido (“smear”) únicamente en el biotipo arroz; mientras que en el biotipo maíz se pueden encontrar de cero a tres bandas por lo general menores a 500 pb (Vélez-Arango, Arango, Villanueva, Aguilera, & Saldamando, 2008)

Nagoshi y colaboradores, (2010) desarrollaron un marcador genético basado en el gen ligado al cromosoma Z Triosa fosfato isomerasa (*Tpi*) para la identificación de biotipos de *S. frugiperda* (Murúa et al., 2015). El uso de este último ha mostrado resultados por lo general consistentes con los generados con el marcador COI (Nagoshi, 2012). Gouin et al. (2017) secuenciaron el genoma completo de los dos biotipos de *S. frugiperda* encontrando diferencias entre ambas poblaciones, indicando que había un número significativo de variaciones en los genes que tienen que ver con la detoxificación y digestión de sustancias en cada biotipo, lo cual es consistente con la adaptación diferencial a las plantas hospedantes que cada biotipo ataca.

### **1.1.5 Estrategias de control**

Los métodos empleados para el manejo de *S. frugiperda* abarcan la aplicación de insecticidas sintéticos, la siembra de plantas transgénicas, el control biológico, y el control cultural.

El control químico es la práctica más empleada para reducir el daño ocasionado por el gusano cogollero. Los insecticidas recomendados para el manejo de esta plaga incluyen esfenvalerato, carbaril, clorpirifos, malatión, permetrina y lambdacialotrina (CABI, 2019). La aplicación de estas sustancias presenta diversos inconvenientes; en primer lugar, debido a su alta toxicidad provocan un impacto en la salud humana y animal, contaminan

el agua y el suelo (Togola et al., 2018) y afectan la entomofauna benéfica, dentro de la cual se encuentran parasitoides y depredadores que naturalmente controlan las poblaciones de la plaga (FAO, 2018). Su alto costo conlleva a un incremento en los costos directos de producción, y su constante aplicación genera la aparición de poblaciones de insectos resistentes (Yu, 1991). Con referencia a lo anterior, en el continente americano, se ha reportado la presencia de *S. frugiperda* resistente a insecticidas del modo de acción de la categoría 1A (carbamatos), 1B (organofosforados) y 3A (piretrinas y piretroides) (Day et al., 2017).

El maíz genéticamente modificado que expresa las proteínas Cry1F, Cry1Ab, Cry1A y Cry2Ab2 de *Bacillus thuringiensis* (Bt), ha sido usado para el control de *S. frugiperda* en Estados Unidos, (Reay-Jones et al., 2016), y en varios países de Sur América (Burtet et al., 2017; Storer et al., 2010).

Si bien la siembra de maíz Bt logra reducir la aplicación de plaguicidas en el control de *Spodoptera*, su uso continuo impone una presión de selección sobre la plaga que da lugar a la aparición de poblaciones resistentes (Burtet et al., 2017). Actualmente, hay reportes de resistencia en Puerto Rico (Storer, Kubiszak, King, Thompson, & Santos, 2012), Brasil (Farias et al., 2014) y Estados Unidos (Huang et al., 2014). En Colombia, varios estudios han mostrado que *S. frugiperda* presenta una tendencia a adquirir tolerancia a las toxinas Bt. Zenner de Polanía, Arévalo-Maldonado, Mejía-Cruz, & Díaz\_Sánchez (2009) mostraron que larvas pertenecientes a una población del Tolima disminuyeron la susceptibilidad a la toxina Cry1Ab a través del tiempo en comparación con una población no expuesta a presión de selección. En otro trabajo, Ríos-Díez, Siegfried, & Saldamando-Benjumea, (2012) evaluaron la susceptibilidad de poblaciones de arroz y maíz del departamento del Tolima a las toxinas Cry1Ac y Cry1Ab, en donde el biotipo arroz mostró mayor susceptibilidad que el biotipo maíz a ambas endotoxinas, presentándose una respuesta de susceptibilidad más fuerte a la toxina Cry1Ab que a la Cry1Ac. Finalmente, Jaramillo-Barrios, Quijano, & Andrade (2019); registraron la presencia de larvas de *S. frugiperda* en el híbrido de maíz 30F35HR que expresa la endotoxina Cry1F. Aunque la acumulación de larvas fue mayor en el genotipo que no expresa la endotoxina (30F35R), la presencia de larvas y daño causado al genotipo modificado genéticamente, indica que éste no ejerció un control total sobre las poblaciones del insecto y que, por lo tanto, la plaga podría estar mostrando cierto grado de resistencia a las plantas que exhiben esta endotoxina.

Con respecto a las estrategias de control biológico; varias especies de parasitoides, depredadores y patógenos atacan huevos, larvas, pupas y adultos de *S. frugiperda*. La mayoría de parasitoides descritos son avispas y en menor frecuencia moscas; su mecanismo de acción consiste en el depósito de huevos en el interior de otros insectos huésped, dentro del cual se desarrollarán sus formas larvarias a expensas del consumo de los tejidos del huésped hasta matarlo (FAO, 2018). Molina-Ochoa, Carpenter, Heinrichs, & Foster, (2003), publicaron un inventario de 150 especies de parasitoides compilado a través de una revisión de literatura que incluía reportes de estudios de Estados Unidos, México y América Latina. Encontraron que se distribuían en catorce familias, nueve en Hymenoptera, cuatro en Diptera y uno en Nematoda. Parece que el control natural que ejercen estos insectos es de considerable importancia, y se han encontrado niveles de parasitismo entre el 20-70% en larvas de *S. frugiperda* (CABI, 2019), por tal razón; el empleo de insecticidas de amplio espectro podría ser contraproducente, teniendo en cuenta el efecto que puede tener en los enemigos naturales de la plaga y las ya mencionadas repercusiones negativas en el ambiente.

Dentro de los patógenos empleados en el biocontrol de *S. frugiperda*, se encuentran hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, (Senyo et al., 2019) y Baculovirus, tales como nucleopolyhedrovirus que infectan específicamente a *S. frugiperda*, presentando un potencial para el control de esta plaga (Gómez, Guevara, Cuartas, Espinel, & Villamizar, 2013).

El control cultural incluye actividades como preparación del suelo, programación de fecha de siembra, cosecha temprana, destrucción de huéspedes alternativos, destrucción de los residuos de cultivos, cultivos alternados, rotación de cultivos, manejo de la fertilidad del suelo y manejo del agua (Prasanna et al., 2018).

Finalmente, es importante mencionar, que se han encontrado diferencias en la respuesta de los biotipos a las medidas de control químico y biológico (Pashley, 1986; Veenstra, Pashley, & Ottea, 1995), siendo el biotipo maíz más resistente al control con toxinas Bt que el biotipo arroz (Adamczyk, Holloway, Leonard, & Graves, 1997; del Valle Loto, Carrizo, Romero, Baigorí, & Pera, 2019; Ríos-Díez et al., 2012). Además, este último presenta mayor susceptibilidad a insecticidas como el diazinón y el carbaril, mientras que el biotipo

maíz es más sensible al carbofurano (Adamczyk et al., 1997). Evaluaciones realizadas con larvas de 3er instar en Colombia; mostraron que el biotipo arroz desarrollaba una mayor resistencia a los insecticidas lambda-cialotrina y metomil en comparación con larvas del biotipo maíz en condiciones de laboratorio (Ríos-Díez & Saldamando-Benjumea, 2011). Dadas estas diferencias, se resalta la importancia de una adecuada identificación de las poblaciones a fin de estructurar programas de control y manejo eficientes de la plaga.

### 1.1.6 La microbiota asociada a insectos

Al igual que otros animales, los insectos conviven con una variedad de microorganismos eucariotas (hongos y protozoarios) y procariotes (bacterias y arqueas), con los que establecen diferentes tipos de relaciones globalmente denominadas simbiosis. Las simbiosis abarcan el comensalismo, parasitismo y mutualismo entre un microorganismo al cual se le denomina simbionte y un insecto que recibe el nombre de huésped (van den Bosch & Welte, 2017). Se reconocen dos tipos de simbioses; primarios y secundarios. Los simbioses son considerados como primarios u obligados si son requeridos por el huésped para su supervivencia o apropiado funcionamiento (Hajek, Morris, & Hendry, 2019). Generalmente habitan órganos especializados denominados bacteriomas, conformados por células llamadas bacteriocitos (Moran, McCutcheon, & Nakabachi, 2008). Este tipo de simbioses se caracterizan por establecer una estrecha relación de interdependencia con su huésped (mutualismo obligado), se transmiten vía materna y sus genomas son muy pequeños y normalmente conservan genes relacionados con funciones nutricionales y en algunos casos con funciones defensivas (van den Bosch & Welte, 2017). Un ejemplo de este tipo de simbionte es la bacteria *Buchnera aphidicola* presente en áfidos, la cual es requerida para la síntesis de aminoácidos que están en baja concentración en el floema de las plantas de las que se alimenta el insecto, en ausencia de esta bacteria el áfido es incapaz de reproducirse (Douglas, 1998).

En contraste con los simbioses primarios, los simbioses secundarios o facultativos no son requeridos para la reproducción del huésped, pueden invadir varios tipos de células, incluyendo órganos reproductivos o vivir extracelularmente en las cavidades corporales (Moran et al., 2008), como por ejemplo el tracto gastrointestinal. Dentro de esta categoría encontramos por un lado los simbioses facultativos mutualistas que le otorgan ventajas al insecto huésped, como la protección frente a patógenos y parasitoides, resistencia al calor

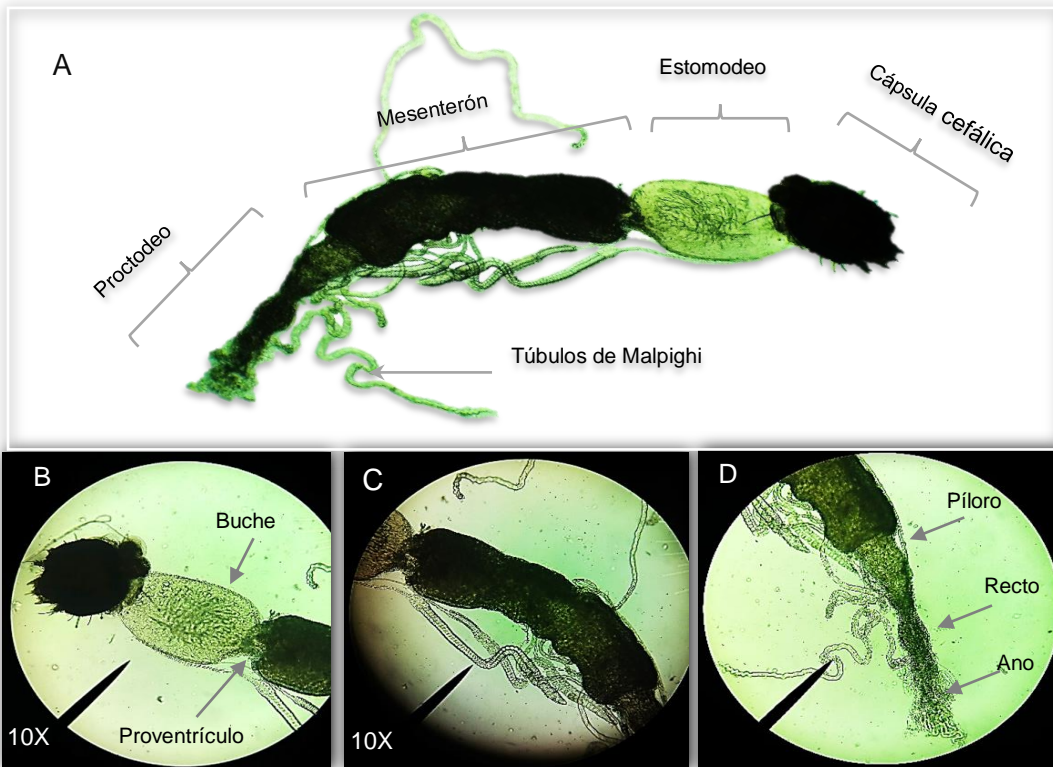
y a condiciones ambientales adversas (Paniagua, Frago, Kaltenpoth, Hilker, & Fatouros, 2018). De otro lado, tenemos los simbioses manipuladores reproductivos, que son parásitos que se transmiten por vía materna, y pueden inducir cambios en los patrones reproductivos de sus huéspedes a través de la feminización de los aparatos reproductivos de los machos, inducción de partenogénesis, muerte de los machos durante la embriogénesis, incompatibilidad citoplasmática, entre otros (Engelstädter & Hurst, 2009). El manipulador reproductivo mejor estudiado es *Wolbachia pipientis*, el cual se encuentra ampliamente distribuido en artrópodos y otros invertebrados (Stouthamer, Breeuwer, & Hurst, 1999).

### 1.1.7 El tracto gastrointestinal de lepidópteros como hábitat microbiano

Al igual que en otros insectos, el intestino de los lepidópteros consiste en un tubo simple en el que se distinguen tres regiones: anterior (estomodeo), media (mesenterón) y posterior (proctodeo) (Chapman & Chapman, 1998) (figura 1-3). Las porciones anterior y posterior del intestino están recubiertas por quitina y las glicoproteínas cuticulares que conforman el exoesqueleto. Esta envoltura separa el lumen intestinal de las células de la epidermis y es reemplazado después de cada muda o ecdisis. El intestino medio es la región en la cual ocurre la digestión y absorción, no posee exoesqueleto y sus células epiteliales secretan una envoltura llamada matriz o membrana peritrófica que se encuentra en constante recambio. La presencia de la membrana peritrófica hace que se generen dos espacios: el espacio endo y ectoperitrófico; los microorganismos normalmente no entran en contacto con el epitelio y se encuentran confinados al espacio ectoperitrófico (Engel & Moran, 2013).

**Figura 1-3.** Detalle del tracto gastrointestinal completo de larvas de *S. frugiperda*

Región anterior (A), región media (B) y región posterior (C). Fuente propia.



Las características fisicoquímicas del entorno intestinal constituyen otro factor determinante para la colonización microbiana. En los lepidópteros se presentan condiciones variables en cuanto disponibilidad de oxígeno y pH. En la región anterior el pH es aproximadamente neutro, mientras que en la región media se presenta un ambiente fuertemente alcalino ( $\text{pH} > 10$ ), lo que representa un ambiente extremo para los microorganismos (Harrison, 2001). Además, dada la complejidad de su ciclo de vida, el intestino de estos insectos representa un hábitat inestable desde la perspectiva de la colonización microbiana (Engel & Moran, 2013). Debido a lo anterior, el papel funcional del microbioma intestinal de los lepidópteros ha sido cuestionado por un estudio reciente en el que se informa que las larvas de lepidópteros albergan pocas o ninguna bacteria residente en comparación con otros órdenes de insectos (Hammer, Janzen, Hallwachs, Jaffe, & Fierer, 2017).

Si bien las larvas de los lepidópteros presentan generalmente microbiomas simples y variables en sus intestinos (Jones, Mason, Felton, & Hoover, 2019a), varios estudios han revelado que las bacterias asociadas con este grupo de insectos pueden contribuir con



funciones fisiológicas esenciales; como por ejemplo, facilitando la adquisición y digestión de nutrientes (Xia et al., 2017), superando la respuesta de plantas frente al ataque de herbívoros (Visôto, Oliveira, Ribon, Mares-Guia, & Guedes, 2009), y mejorando la respuesta inmune en la protección de patógenos (Shao et al., 2017).

### 1.1.8 La microbiota en *Spodoptera*

El género *Spodoptera* comprende alrededor de 30 especies la mayoría de las cuales son plagas de cultivos de importancia económica (Dumas, Barbut, et al., 2015). A pesar de esto, son relativamente pocos los estudios en los que se ha evaluado la composición de las comunidades microbianas asociadas a este grupo de insectos.

Gao et al. (2019) estudiaron la diversidad microbiana de *Spodoptera exigua* mediante un análisis de las secuencias de la región de ADNr 16S y encontraron que los clados bacterianos dominantes pertenecían a Proteobacterias y Firmicutes con un predominio del género *Enterococcus*. En diferentes trabajos se ha explorado la comunidad bacteriana cultivable del intestino de larvas del género *Spodoptera* en busca de bacterias con acción insecticida. En *Spodoptera exigua* se evaluó el potencial larvicida de dichos aislamientos, encontrando que *Bacillus thuringiensis* Se13 provocaba un 100% de mortalidad en larvas de tercer instar (Eski, Demir, Güllü, & Demirbağ, 2018). En otra investigación con un enfoque similar Thakur, Dhammi, Saini, & Kaur, (2015) determinaron que la bacteria que presentaba mejor potencial insecticida era *Enterobacter cloacae* causando una mortalidad del 73.33% en larvas de *S. litura*.

*S. litoralis* es quizá la especie en la que se concentran el mayor número de investigaciones dentro de este género de insectos. Usando Secuenciación de Nueva Generación se investigó la diversidad y actividad de su microbiota intestinal a lo largo de su ciclo de vida, y se develó que ocurren importantes cambios en la composición de la diversidad microbiana a lo largo de las diferentes fases de desarrollo del insecto (Chen et al., 2016). En un interesante trabajo Shao et al., (2017), mostraron que *Enterococcus mundtii*, una bacteria simbiótica intestinal asociada con *S. litoralis*, puede secretar una bacteriocina llamada mundticina KS que tiene acción antibiótica frente a bacterias patógenas invasoras, pero no contra otras bacterias residentes del intestino. Lo anterior muestra una clara

asociación entre bacterias residentes intestinales y el mejoramiento del sistema de defensa del huésped.

En *S. frugiperda* existen trabajos previos en los que se ha investigado la microbiota mediante métodos dependientes e independientes de cultivo. McCarthy, Cabrera, & Virla (2015); investigaron la microbiota intestinal de *S. frugiperda* empleando métodos metatranscriptómicos. Se evaluaron larvas recolectadas en cultivos argentinos de maíz transgénico, maíz tradicional y en sorgo. Se encontró que del 97% de los transcritos con homología a eucariota, menos del 1% correspondían a hongos, kinetoplastidios y viridiplantae, entre otros. De un 0.28%- 0.07% a transcritos bacterianos, 0,003%-0.001% a archaea y 0.03%- 0% a virus.

En una investigación llevada a cabo en Brasil, de Almeida et al. (2017) realizaron la identificación molecular de la microbiota intestinal correlacionada con la respuesta de tolerancia a insecticidas en larvas de *S. frugiperda* resistentes a los insecticidas lambda-cialothrina, deltametrina, clorpirifos, spinosad y lufenuron. En este estudio se identificaron las bacterias: *Enterococcus casseliflavus*, *Delftia lacustris*, *Enterococcus mundtii*, *Leclercia adecarboxylata*, *Microbacterium paraoxydans*, *Pseudomonas stutzeri*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Arthrobacter nicotinovorans*, *Enterococcus casseliflavus*, *Pseudomonas psychrotolerans*, *Enterococcus mundtii*, *Staphylococcus sciuri* subsp. *sciuri*, *Microbacterium arboresces* por métodos de secuenciación de nueva generación, todas estas bacterias actuaron en conjunto o por separado en la degradación de estos insecticidas, demostrando su posible rol en la respuesta de resistencia del insecto.

Recientemente Jones, et al. (2019) estudiaron las comunidades bacterianas del intestino anterior e intestino medio de *S. frugiperda* en larvas de último instar provenientes de cultivos de maíz mediante métodos dependientes e independientes de cultivo. Se encontraron diferencias significativas en la composición bacteriana del intestino medio y la secreción regurgitante (intestino anterior), sugiriendo que la fisiología de las diferentes regiones intestinales puede afectar la composición o abundancia bacteriana. En este trabajo se evaluó también el efecto de la planta hospedante en la estructuración de las comunidades bacterianas intestinales; para esto se tomaron larvas provenientes de posturas de insectos silvestres y de una colonia de laboratorio. Las larvas fueron

alimentadas con estigma de maíz o con hojas de soja. Se encontró una alta variabilidad en la composición y abundancia bacteriana del intestino entre individuos de la misma especie, aún en aquellos alimentados de la misma fuente de alimento. Los resultados indican, además, que la planta huésped (maíz o soja) tuvo mayor influencia en la composición de las comunidades bacterianas del intestino medio que la fuente de huevos.

En otro trabajo, Gichuhi et al. (2019) estudiaron la composición, abundancia y diversidad del microbioma asociado al intestino de larvas y adultos de *S. frugiperda* recolectados en 18 regiones productoras de maíz en Kenia mediante secuenciación de nueva generación. Los phyla más abundantes identificados fueron Proteobacteria y Firmicutes, y se observaron diferencias en la diversidad bacteriana entre larvas y adultos.

En Colombia, Higueta-Palacio et al., (2021) encontraron que la diversidad del microbioma bacteriano de *S. frugiperda* presentó diferencias significativas entre las temporadas seca y lluviosa en larvas L5 del biotipo maíz, indicando la importancia de las épocas de captura del insecto y el hallazgo de una composición de microbiota diferencial de acuerdo con las condiciones ambientales del hábitat en el momento de la captura. Los autores encontraron además una diversidad baja y un núcleo microbiano compuesto por los géneros *Enterococcus*, *Erysipelatoclostridium*, *Rashtonia* y *Rhizobium*. Este es el único estudio encontrado en Colombia en el que se explora el microbioma de *S. frugiperda*. Sin embargo, los resultados solo se limitan al biotipo maíz y al microbioma de un estadio larvario. Hasta la fecha solo el trabajo de Oliveira, Rodrigues, & Cônsoli (2021) tiene en cuenta el análisis de las comunidades microbianas en CS y RS, pero solo se estudian las larvas maduras de la plaga y se compara el microbioma en diferentes regiones geográficas.

En ninguno de los estudios encontrados, se realizó la evaluación del microbioma *S. frugiperda* a lo largo de las fases de desarrollo del insecto. El estudio de la dinámica de la microbiota durante el ciclo de vida es de gran importancia si consideramos que en esta especie como en todos los insectos holometábolos, ocurren una serie de transformaciones durante su ciclo de vida que abarcan mudas sucesivas de su exoesqueleto (incluyendo el asociado al tracto digestivo), y cambios dramáticos a nivel morfológico, fisiológico y de estilo de vida después de la metamorfosis. Todo lo anterior podría influenciar la conformación y ensamblaje de las comunidades microbianas intestinales, las que a su vez pueden desempeñar un papel relevante desde el punto de vista evolutivo y adaptativo del

insecto. Cabe resaltar que, la mayoría de estudios relacionados con la microbiota del *S. frugiperda* son realizados en larvas maduras y no se tiene en cuenta el biotipo, lo cual reviste gran importancia dadas las diferencias entre ellos.

## 2.Hipótesis

**Ho:** No existen diferencias en la composición de las comunidades microbianas asociadas a los biotipos de *S. frugiperda* durante la metamorfosis del insecto.

**Ha:** Existen diferencias en la composición de las comunidades microbianas entre los biotipos de *S. frugiperda* y durante el ciclo de vida del insecto.

## 3. Objetivos

### 3.1 Objetivo general

Caracterizar la microbiota de los biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* durante las fases de su desarrollo

### 3.2 Objetivos específicos

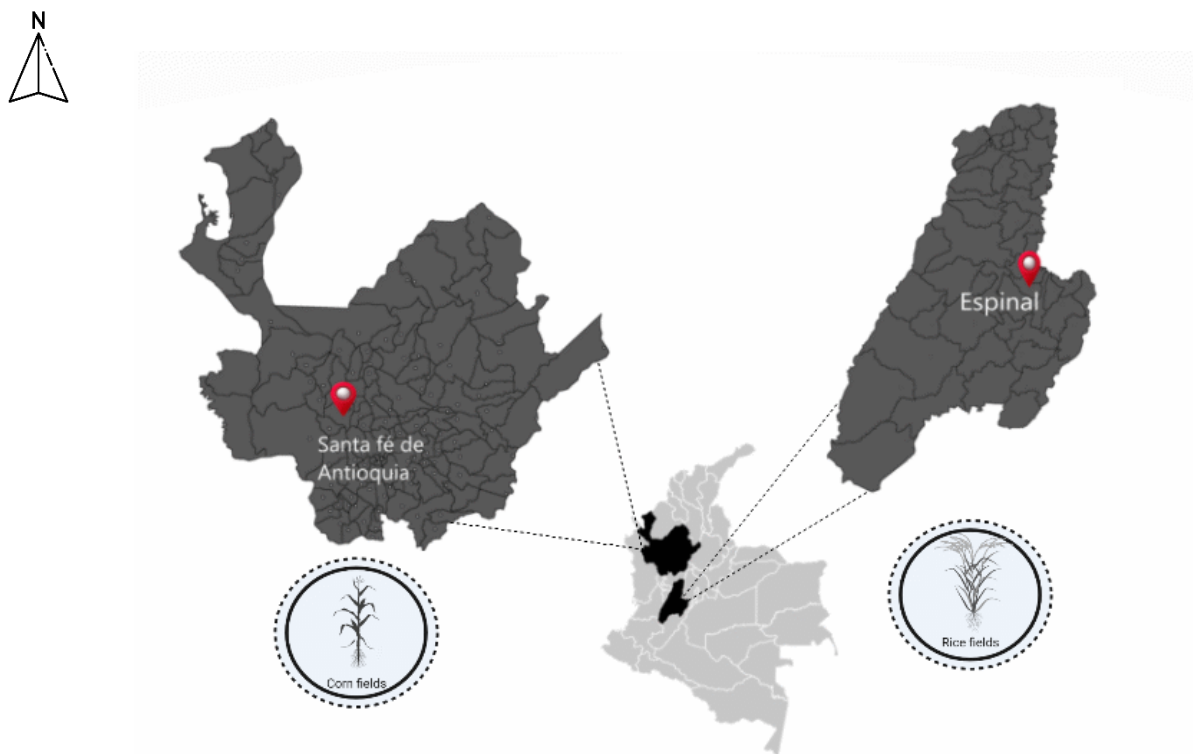
- Identificar las comunidades bacterianas asociadas al tracto gastrointestinal del biotipo maíz de *Spodoptera frugiperda* durante las diferentes etapas de su desarrollo.
- Evaluar las comunidades bacterianas asociadas al tracto gastrointestinal del biotipo arroz de *Spodoptera frugiperda* durante las diferentes etapas de su desarrollo.
- Comparar la diversidad microbiana del tracto gastrointestinal de los biotipos maíz y arroz de *Spodoptera frugiperda*.

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1 Captura y cría de insectos

Para la generación de las colonias de *S. frugiperda* biotipos maíz y arroz se recolectaron larvas silvestres provenientes de cultivos con signos de la presencia de la plaga. Se obtuvieron 150 larvas de estadios L4-L6 a partir de plantaciones de maíz en el departamento de Antioquia, municipio de Santa Fe de Antioquia (Estación Agraria ‘Cotové’ - Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín (6°31'54.0"N 75°49'33.8"W) durante el mes de junio de 2019. Adicionalmente, se recolectaron aproximadamente 100 larvas de estadios L3-L5 de cultivos de arroz del departamento del Tolima, municipio El Espinal (4°08'55"N 74°52'55"W) durante el mes de octubre de 2019 (figura 4-1).

**Figura 4-1.** Localización sitios de muestreo.



Las larvas se separaron en contenedores individuales y fueron llevadas al Laboratorio de Ecología y Evolución de Insectos de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, en donde se realizó una clasificación inicial basada en caracteres morfológicos (Stehr, 1987). Las larvas fueron mantenidas con hojas de los cultivos hasta su último estadio larvario. Los adultos que se generaron a partir de las larvas silvestres se alimentaron

mediante una mota de algodón saturada con una solución de agua-miel estéril en proporción 1:1, la cual se cambió diariamente. Se establecieron dos colonias, denominadas colonia CS (Corn-strain: biotipo maíz) y colonia RS (Rice strain: biotipo arroz), de acuerdo con el cultivo de procedencia, las cuales se mantuvieron separadas en contenedores de 7.5 litros con un orificio en la tapa recubierto con gasa para facilitar la aireación. Los adultos obtenidos a partir de la generación de insectos de campo se cruzaron entre sí y separadamente dentro de la colonia de procedencia. La descendencia generada fue usada para los ensayos subsiguientes, y se alimentaron con dieta estéril de acuerdo con el protocolo de Shorey & Hale, (1965) modificado (Anexo A). Las crías se mantuvieron a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ,  $70\% \pm 5$  RH (humedad relativa) y un fotoperiodo de 12:12 h- L: D (luz: oscuridad).

La captura de insectos se realizó con el permiso de recolecta y acceso a recurso genético 4120E1-44703 del 24 abril de 2008 del Ministerio de Medio ambiente de Colombia.

## 4.2 Obtención de tejidos

Con el fin de realizar un reconocimiento de las estructuras digestivas de larvas de diferentes estadios de desarrollo y de adultos de *S. frugiperda* se separó un grupo de insectos que fue usado para estandarizar la técnica de disección y para establecer la cantidad mínima de tejidos a ser destinada en los ensayos subsiguientes (anexos A y B). Posteriormente, a partir de cada colonia se seleccionaron larvas de 1er- 3er instar (denominadas larvas jóvenes- Larvae\_Y), larvas de 4to-6to instar (larvas tardías- Larvae\_L), machos adultos (Adult\_M) y hembras adultas (Adult\_F) a partir de cada colonia. Los insectos se congelaron durante 10 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$  para disminuir las funciones vitales y posteriormente se lavaron superficialmente con una solución de PBS 1X + Tween-20 (1%) seguido de una desinfección con etanol al 70% y un enjuague final con PBS 1X (Vivero Gómez, 2016), 2016). Se llevó a cabo la disección del tracto gastrointestinal completo de cada individuo (figura 4-2) usando fórceps estériles (anexo A). Se separaron grupos de seis intestinos para las muestras de larvas (larvae\_Y y Larvae\_L). Los intestinos de los insectos adultos se procesaron separadamente. Los sacos de huevos se dispusieron en grupos entre 3 y 5 sacos por muestra y se procesaron sin previa esterilización. Las pupas se lavaron y desinfectaron siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Vivero Gómez, 2016) y se extrajo su contenido interno antes de su procesamiento. Todas las muestras de



tejidos fueron pesadas y maceradas en 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1X estéril. 100  $\mu\text{L}$  del homogeneizado fue empleado para estudiar las comunidades bacterianas mediante métodos dependientes de cultivo. La cantidad restante fue preservada en etanol al 70% a  $-20^{\circ}\text{C}$  para los análisis independientes de cultivo.

### 4.3 Identificación de los biotipos de *S. frugiperda*

Para la confirmación de los biotipos arroz y maíz de los insectos usados en los ensayos se separó la región cefálica y caudal de larvas y adultos y una porción de los tejidos de pupas y huevos y se extrajo su ADN mediante el método de Grind buffer descrito por Porter & Collins (1991). El ADN extraído se usó para las reacciones de PCR-RFLP de la región COI del ADN mitocondrial y PCR de la región nuclear FR.

#### 4.3.1 Amplificación de la región Citocromo Oxidasa I por PCR

Para la primera técnica, se emplearon los cebadores JM76 F (5' GAGCTGAATTAGG (G/A) ACTCCAGG3') y JM77 R (5' ATCACCTCC (A/T) CCTGCAGGATC 3') (Nagoshi & Meagher, 2004a). Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 2  $\text{Ml}$  de buffer de Taq polimerasa (10X) (Fermentas, California USA), con  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , 1.6  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM (Fermentas), 0.4  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10M) (Invitrogen, California USA), 0.8  $\mu\text{L}$  de cebador forward JM76, 0.8  $\mu\text{L}$  de cebador reverse JM77, 0.5  $\mu\text{L}$  (5U/l) de Taq ADN polimerasa (Fermentas), 12.2  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y 2.0  $\mu\text{L}$  de ADN (50 ng), para un volumen final de reacción de 20  $\mu\text{L}$ . Para la PCR se realizó un ciclo inicial de  $94^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos, seguido de 30 ciclos a  $94^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto,  $62^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto y  $72^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto, y un ciclo de extensión final de  $72^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Posteriormente, se tomaron 300 ng de la mezcla de PCR a la que se les adicionaron 2  $\mu\text{l}$  de Buffer Tango 10X (Fermentas, California U.S.A) y 0.5  $\mu\text{L}$  de la enzima *MspI* (10U/  $\mu\text{L}$ ) y 9.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . La mezcla anterior fue incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 2h, con el fin de realizar la digestión de los productos de PCR. Las muestras se analizaron en un gel de agarosa al 2% y teñidas con EzVision® y se visualizaron en un transiluminador UV. En el gel se visualiza un fragmento de 497 pb y otro de 72 pb si la muestra corresponde a *S. frugiperda* biotipo maíz, y no se observa digestión para el caso del biotipo arroz (Cano-Calle, Arango-Isaza, & Saldamando-Benjumea, 2015).

### 4.3.2 PCR de la región nuclear FR

Para la amplificación de la región FR, se realizaron reacciones de PCR que contenían 2  $\mu\text{L}$  de buffer de Taq polimerasa (10X) (Fermentas, California U.S.A) con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1.6  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM (Fermentas), 0.5  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10M) (Invitrogen), 0.8  $\mu\text{L}$  de cebador FR-a (5' TTTTACACCGGTCACAACGA 3') (Nagoshi & Meagher, 2003), 0.8  $\mu\text{L}$  de cebador FR-2 (5' GACATAGAAGAGCACGTTT 3') (Nagoshi & Meagher, 2003), 0.5  $\mu\text{L}$  (5U/l) de Taq ADN polimerasa (Fermentas), 12.2  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y 2.0  $\mu\text{L}$  de ADN (50 ng). Se realizó un ciclo inicial de 94°C por 3 minutos, seguido por 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto y por último un ciclo extra de 72°C por 10 minutos. Las muestras fueron analizadas en un gel de agarosa al 2% y teñidas con EzVision® y se visualizaron en un transiluminador UV. La visualización de fragmentos menores a 500 pb es indicativa del biotipo maíz; mientras que para el biotipo arroz se espera la generación de fragmentos mayores a 500 bp en la región FR de alto peso molecular. Los híbridos entre los biotipos fueron identificados porque su ADN muestra digestión con la enzima *MspI* y a su vez amplificaciones mayores a 500 bp con los cebadores de la región FR o porque no presentan digestión con la enzima *MspI* y se obtienen productos de amplificación menores a 500 pb con los cebadores de la región FR (Vélez-Arango, Arango, Villanueva, Aguilera, & Saldamando, 2008).

## 4.4 Técnicas dependientes de cultivo

### 4.4.1 Recuento y aislamiento de bacterias

Para el aislamiento, selección y mantenimiento de los microorganismos se usó el medio Luria Bertani (LB) (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, y agar 15 g/L) El LB es un medio rico que permite el estudio de una variedad de bacterias facultativas (MacWilliams & Liao, 2006).

A partir de los homogeneizados de los tejidos se realizaron diluciones seriadas en base 10 desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  utilizando como diluyente PBS estéril. Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de tres de las diluciones de acuerdo con ensayos previos, y se hicieron siembras en la superficie de agar LB de cada dilución por triplicado. Se incluyeron como controles la siembra del

diluyente (PBS), control de esterilidad del medio, control de dieta (siembra de la primera dilución de la dieta con que se alimentaron los insectos) y control del agua del enjuague final del lavado de las pupas. Los cultivos fueron incubados a 37°C durante 24- 48 horas hasta la obtención de colonias visibles. Para el recuento de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) se tuvieron en cuenta las cajas de cultivos que presentaban entre 30-300 colonias. La estimación de las poblaciones de bacterias aerobias mesófilas cultivables se obtuvo mediante el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de tejido. Los datos fueron transformados a log en base 10 de UFC/g. Se identificaron los morfotipos bacterianos presentes en los cultivos con base en sus características macroscópicas (forma, borde, color y elevación). Cada morfotipo fue purificado por medio de pases sucesivos en agar LB y se obtuvo su caracterización microscópica a través de la coloración de Gram y posteriormente se criopreservaron en medio LB suplementado con glicerol al 20 % a -20°C.

Se utilizó el test de Krustal Wallis y la prueba de Dunn para comparar los recuentos de bacterias entre los biotipos y estados de desarrollo del insecto, mediante el programa IBM SPSS Statistics® version 22 (IBM Corp, 2013).

#### **4.4.2 Selección de bacterias mediante Análisis del Espaciador Interno Transcrito (ITS)**

A las bacterias aisladas se les realizó una amplificación por PCR del Espaciador Interno Transcrito (ITS) entre las regiones del ADNr 16S y 23S. Este método de huella genética permite agrupar y seleccionar las bacterias con base en la similitud en el patrón de bandas obtenido por PCR. Para lo anterior, se extrajo el ADN genómico de cada aislado bacteriano mediante el método de lisis térmica de acuerdo con el protocolo descrito por Sanders & Miller, (2010). Cada bacteria fue cultivada en 3 mL de caldo LB a 37°C, 90 rpm durante 24-48 horas (o hasta aparición de turbidez). Luego de este tiempo, la biomasa bacteriana fue separada del medio de cultivo por centrifugación a 8.000 r.p.m seguido de dos lavados con agua destilada estéril para eliminar los remanentes del medio de cultivo. El pellet de bacterias se resuspendió en 50 µL de TE 0,1X Tris-HCl en tubos eppendorf de 1,5 mL y se incubó a 95°C durante 10 minutos. El DNA fue separado por centrifugación a 5000 r.p.m. durante 5 minutos y se realizó una dilución 1:10 en agua ultra pura.

Para la PCR se emplearon los cebadores universales L1 (5'CAAGGCATCCACCGTGT3') y G1 (5'GAAGTCGTAACAAGG3') (Jensen, Webster, & Straus, 1993). Los productos de PCR se separaron en geles de poliacrilamida (PAGE) 8% (v/v), 110 V, 100 min y se visualizaron por tinción con nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) (Amresco). Se realizó un análisis de conglomerados utilizando el coeficiente de Pearson y el método de agrupamiento de enlace simple en el software GelCompar II (Applied Maths Biosystems, Belgium). Se seleccionaron aislados representativos de cada conglomerado formado a un porcentaje de similitud  $\geq 65\%$  para la identificación molecular subsiguiente.

#### **4.4.3 Clasificación taxonómica de aislados bacterianos utilizando secuenciación de los genes ARNr 16S y *gyrB***

Se usó el kit Ultraclean Microbial DNA isolation (MOBIO) para la extracción del ADN de cada aislado bacteriano seleccionado previamente siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se llevaron a cabo reacciones de PCR para amplificar un fragmento de aproximadamente 1.5 kpb del gen ARNr 16S, empleando los iniciadores Eubac 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1492R (GGT TACCTT GTT ACG ACT T) (Espejo, Feijóo, Romerol, & Vásquez, 1998); en una reacción final de 20  $\mu$ L, con 2  $\mu$ L de buffer de *Taq* polimerasa (10X) (Fermentas, California USA), 1.6  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25mM (Fermentas), 0.4  $\mu$ L de dNTPs (10mM) (Invitrogen, California USA), 0.2  $\mu$ L de cada cebador, 0.2  $\mu$ L de *Taq* ADN polimerasa (Fermentas, California USA) y 3  $\mu$ L (50 ng) de ADN.

Adicionalmente, con el fin de tener una mejor aproximación a la identificación de especie de algunos de los aislados; se realizó la amplificación de una región de aproximadamente 1.26 kpb del gen *gyrB* usando los cebadores UP1 (5'– AGC AGG GTA CGG ATG TGC GAG CCR TCN ACR TCN GCR TCN GTC AT – 3') y UP2R (5'– GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG CAY GCN GGN GGN AAR TTY GA – 3') (Yamamoto & Harayama, 1995) de acuerdo con el protocolo descrito por Cano-Calle (2020). Se incluyó ADN proveniente de un cultivo puro de *Bacillus* sp. y agua ultrapura como controles positivos y negativos respectivamente para todos los ensayos de PCR.

Los productos de PCR de ARNr 16S y del gen *gyrB* se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñidos con el marcador fluorescente EZ.Vision™ (Amresco, U.S.A). Una vez confirmadas las reacciones, los productos de PCR fueron secuenciados en la compañía Macrogen© (Korea).

La edición y generación de secuencias consenso se realizaron por medio del software Geneious prime 2021 (versión 2.2). Las secuencias curadas y ensambladas se compararon con la base de datos del GenBank utilizando el algoritmo BLASTn (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Se obtuvieron alineamientos de las secuencias usando la herramienta ClustalW del programa Mega X (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018). Se construyeron dendrogramas bayesianos usando el programa Beast v2.6.7 (Drummond & Rambaut, 2007). En los dendrogramas solo se incluyeron las secuencias que después de editadas y curadas tuvieran una longitud mínima de 1000 pb.

## **4.5 Ensayos independientes de cultivo**

### **4.5.1 Obtención de ADN total de tejidos de *S. frugiperda***

Se extrajo el ADN total de los tejidos de diferentes fases de desarrollo de *S. frugiperda* biotipos arroz y maíz obtenidos previamente (sección 4.1.1). Para ello se utilizó el Kit Fast DNA (MP Biomedicals) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se analizó la concentración, calidad, integridad y pureza del material genético usando un espectrofotómetro ND-100 nanodrop Thermo scientific (Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.) y mediante visualización en geles de agarosa al 1% teñidos con el colorante E-ZVision. Adicionalmente, para verificar que el ADN obtenido fuera amplificable; se realizó una PCR de prueba en la que se amplificó el ADNr 16S antes de someter las muestras a secuenciación masiva. Las muestras fueron secadas y almacenadas a -20°C para los análisis subsiguientes.

### **4.5.2 Análisis de las comunidades bacterianas por secuenciación masiva de nueva generación (NGS)**

Se seleccionaron un total de 28 muestras aptas (18 del biotipo maíz y 10 del biotipo arroz) que fueron enviadas a un centro de secuenciación genómica para el análisis por secuenciación masiva (NGS) mediante la plataforma Illumina MiSeq (tabla 4.4). Se realizó la amplificación de la región hipervariable V4 del gen ARNr 16S y se generaron *reads* pareados con una longitud promedio de 253 pb.

**Tabla 4-1.** Muestras de ADN total analizadas por secuenciación masiva (NGS).

Biotipo (Procedencia)	Código muestra	Código abreviado	Fase de desarrollo	Concentración (ng secos)
Maíz	Eggs_C1	CE1	Huevos	1340
	Eggs_C2	CE2	Huevos	936
	Eggs_C3	CE3	Huevos	1436
	Eggs_C4	CE4	Huevos	4396
	Larvae_Y_C2	CYL2	Larvas jóvenes	696
	Larvae_L_C1	CLL1	Larvas tardías	656
	Larvae_L_C2	CLL2	Larvas tardías	1435
	Larvae_L_C3	CLL3	Larvas tardías	4188
	Pupae_C2	CP2	Pupas	11501
	Pupae_C3	CP3	Pupas	455
	Pupae_C5	CP5	Pupas	1930
	Pupae_C6	CP6	Pupas	1975
	Pupae_C7	CP7	Pupas	2185
	Adult_M_C3	CMA3	Adulto macho	981
	Adult_M_C5	CMA5	Adulto macho	1456
	Adult_F_C1	CFA1	Adulto hembra	835
	Adult_F_C2	CFA2	Adulto hembra	960
	Adult_F_C3	CFA3	Adulto hembra	780
Arroz	Eggs_R1	RE1	Huevos	2028
	Eggs_R2	RE2	Huevos	1496
	Eggs_R3	RE3	Huevos	4108
	Larvae_Y_R1	RYL1	Larvas jóvenes	776
	Larvae_Y_R2	RYL2	Larvas jóvenes	976
	Larvae_L_R1	RLL1	Larvas tardías	3752
	Larvae_L_R2	RLL2	Larvas tardías	3092
	Larvae_L_R3	RLL3	Larvas tardías	1435
	Pupae_R1	RP1	Pupas	5622
	Pupae_R2	RP2	Pupas	495
	Adult_F_R1 <sup>2</sup>	RFA1	Adulto hembra	1035
	Adult_F_R2	RFA2	Adulto hembra	605
	Adult_F_R3	RFA3	Adulto hembra	1246
	Adult_M_R1	RMA1	Adulto macho	1625
	Adult_M_R2	RMA2	Adulto macho	1402
Adult_M_R3	RMA3	Adulto macho	1078	

Se siguió el protocolo DADA2 (<https://benjineb.github.io/dada2/>) para la remoción de quimeras, el filtro de secuencias de baja calidad y el ensamblaje de los amplicones. Las

<sup>2</sup> Las muestras de adultos del biotipo arroz no se alcanzaron a procesar a tiempo debido a inconvenientes relacionados con la pandemia del COVID-19, por lo que los resultados no fueron tenidos en cuenta en los análisis.

Variantes de Secuencias de Amplicones (ASVs, por sus siglas en inglés) obtenidas fueron alineadas frente las bases de datos Ribosomal Data Project (RDP) y Silva. En los análisis solo fueron tenidas en cuenta las ASVs con una frecuencia mínima de 0.05% en cada muestra y con un consolidado de la máxima asignación taxonómica para cada ASV. Se utilizó la herramienta MicrobiomeAnalyst (<https://www.microbiomeanalyst.ca/>) para el análisis de las comunidades bacterianas. Las curvas de rarefacción fueron normalizadas con respecto a la muestra con menor número de *reads*. Los datos normalizados fueron usados en los análisis de diversidad. La diversidad alfa de las muestras fue estimada mediante la medición de especies observadas y los índices de Shannon- Wiener, Simpson y Chao1.

Para comparar la estructura de las comunidades bacterianas durante el ciclo de vida del insecto y entre los biotipos se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) usando la matriz de distancia Bray-Curtis. Adicionalmente, se ejecutó un análisis de agrupamiento jerárquico basado en el Coeficiente de Correlación de Pearson. El análisis permutacional de varianza (PERMANOVA) se empleó para medir la significancia estadística de las agrupaciones de las muestras en función de la distancia Bray-Curtis. Se llevó a cabo un Análisis Discriminante Lineal (LDA) junto con el tamaño del efecto (LEfSe) (Segata et al., 2011) para determinar los ASVs bacterianos con abundancia significativa en cada biotipo del insecto y de acuerdo con la fase de desarrollo.

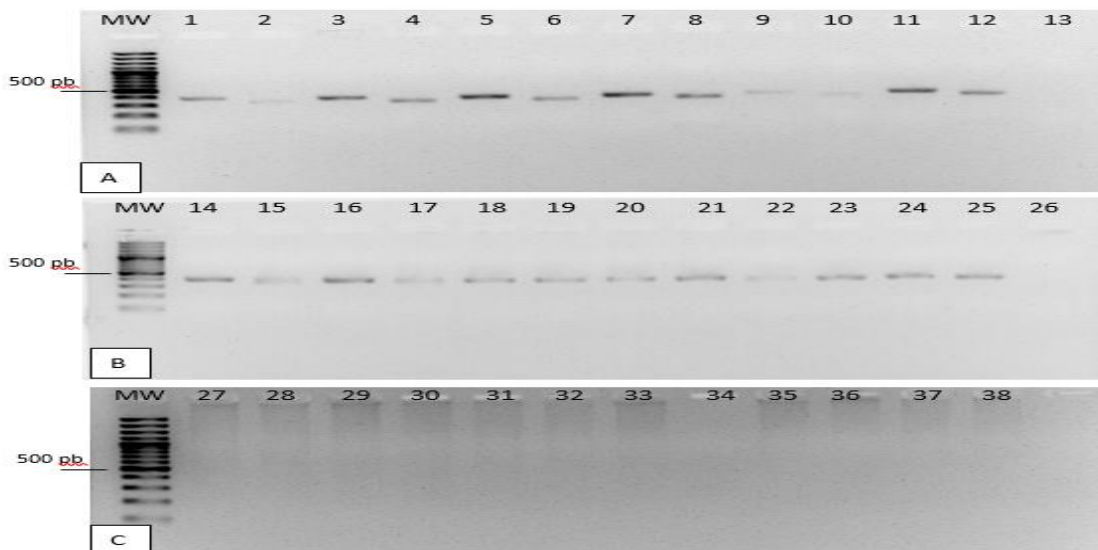
Para establecer un posible “núcleo microbiano”, se realizó un análisis en el que se tuvieron en cuenta los ASVs a nivel de género presentes a una prevalencia del 50% o más de las muestras y con una abundancia relativa > 0,02% en cada librería.

## 5.Resultados

### 5.1 Identificación de los biotipos maíz y arroz de *S. frugiperda*

El análisis por PCR- RFLP de la región COI del ADN mitocondrial permitió determinar que de las 28 muestras incluidas 18 correspondían al biotipo maíz y 10 al biotipo arroz. La acción de la enzima *MspI* sobre los productos de PCR de la región COI, generó la digestión del fragmento amplificado en las muestras del biotipo maíz (5-1 A), y no produjo digestión en las muestras del biotipo arroz (figura 5-1 B). La amplificación del gen nuclear FR en todas las muestras del biotipo arroz exhibe un patrón de barrido o “smear” en la región de alto peso molecular. No fueron detectados híbridos entre los biotipos (figura 5-1 C).

**Figura 5-1.** Identificación de biotipos maíz y arroz por PCR-RFLP de la región COI y PCR de la región FR<sup>3</sup>.



<sup>3</sup> Identificación de biotipos en *S. frugiperda*. A: PCR- RFLP de la región COI de insectos de plantas de maíz. Los números impares son las reacciones de PCR de cada muestra sin digerir, los números pares son las reacciones de PCR luego de ser sometidas a la digestión con la enzima *MspI*. 1 y 2: Control positivo, 13: control negativo. B: PCR- RFLP de la región COI de insectos de plantas de arroz. Los números impares son las reacciones de PCR sin digerir, los números pares son las

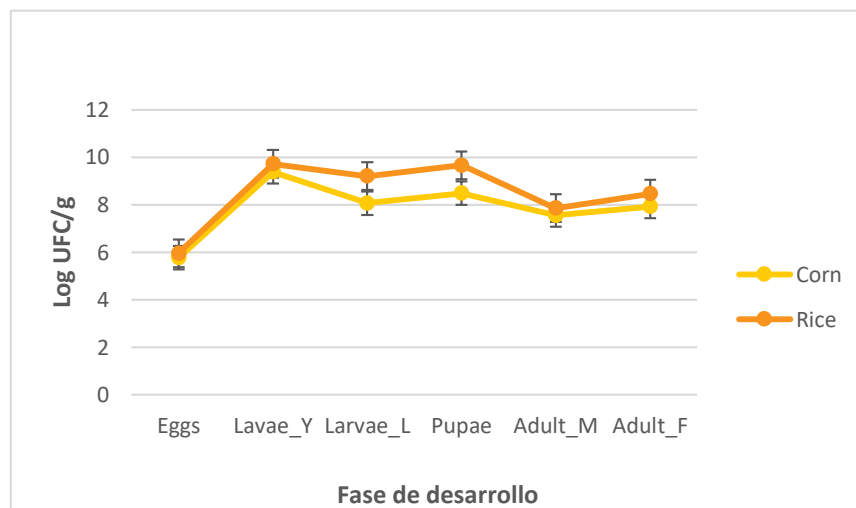


## 5.2 Diversidad bacteriana mediante ensayos dependientes de cultivo

### 5.2.1 Recuento e identificación morfológica

Se estudiaron las bacterias mesófilas aerobias cultivables asociadas a los tejidos de huevos y pupas, así como al tracto gastrointestinal de larvas de estadios tempranos (L1-L3), larvas de estadios tardíos (L4-L6) y adultos (machos y hembras) de *S. frugiperda* biotipos maíz y arroz de dos poblaciones del insecto obtenidas a partir de cultivos de maíz del departamento de Antioquia y de cultivos de arroz del departamento del Tolima respectivamente. Los recuentos más bajos de UFC/g de tejidos se obtuvieron en muestras de huevos en ambos biotipos con valores de 5.8 y 6.2 log UFC/g para los biotipos arroz y maíz respectivamente. En contraste, los conteos más altos fueron observados en las muestras de larvas jóvenes del biotipo maíz con recuentos de 9.4 log UFC/g; y en muestras de pupas del biotipo arroz con un valor de 9.7 log UFC/g (figura 5-2).

**Figura 5-2.** Comparación del conteo promedio de log UFC/g en tejidos de *S. frugiperda* según el biotipo y el estado de desarrollo<sup>4</sup>






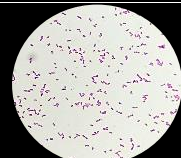

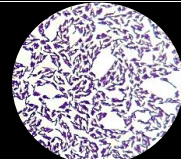
reacciones de PCR luego de ser sometidas a la digestión con la enzima *MspI*. 14 y 15: control positivo, 26: control negativo. C: PCR de la región FR de insectos de plantas de arroz. 27: control positivo y 34: control negativo. MW: marcador de peso molecular.

<sup>4</sup> Eggs: huevos, Larvae\_Y: larvas jóvenes (estadios larvarios L1-L3), Larvae\_L: larvas tardías (estadios larvarios L4-L6), Pupae: pupas, Adult\_M: adultos machos, Adult\_F: adultos hembras, Corn: biotipo maíz, Rice: biotipo arroz.



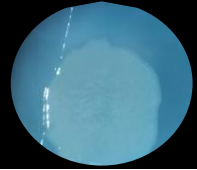
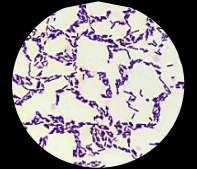
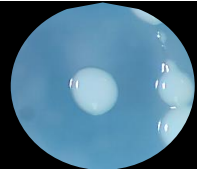
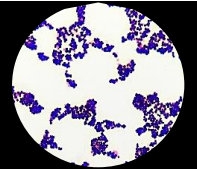

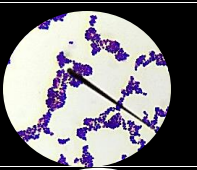

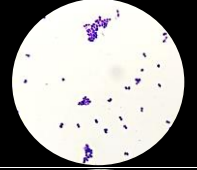



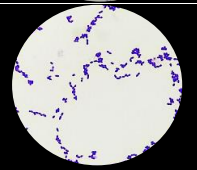

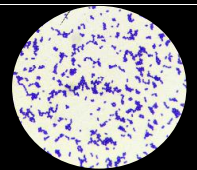
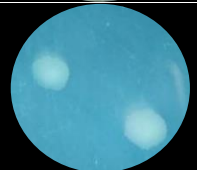
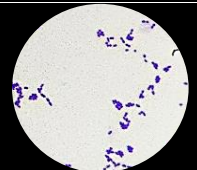

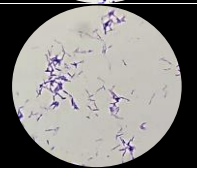
El test de Kruskal-Wallis permitió evidenciar que existen diferencias significativas entre las medianas de los recuentos de UFC/g ( $P < 0.05$ ), en donde los recuentos de pupas del biotipo arroz y larvas tempranas son significativamente mayores que los de adultos y huevos de ambos biotipos (tablas suplementarias C4 y C5) (Test de Dunn al 95% de significancia).

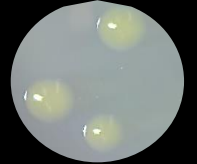


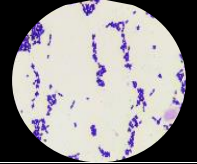

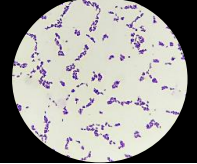

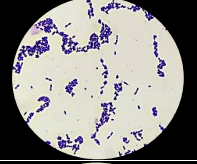
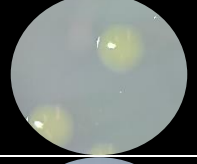
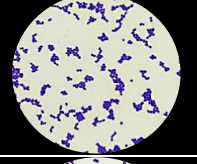

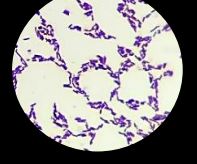
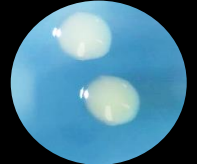
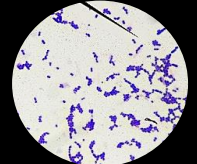
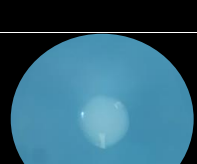

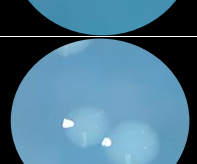
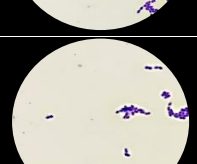
Se recuperaron 87 aislados bacterianos, 44 del biotipo maíz y 43 del biotipo arroz y fueron sometidos a un tamizaje basado en la similitud en los patrones de la Región Espaciadora Interna Transcrita (ITS) (figura suplementaria C1). El análisis de agrupamiento a un 65% de similitud, mostró la formación de 12 grupos. Se seleccionaron un total de 37 aislados bacterianos representativos. La caracterización preliminar de los aislados con base en sus atributos morfológicos y la coloración de Gram reveló que el 92% de la población correspondía a bacterias gram positivas y el 8% restante a bacterias gram negativas (tabla 5-1). Se realizó la secuenciación del gen ARNr 16S de los aislados con el fin de determinar su filiación taxonómica.


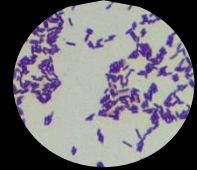

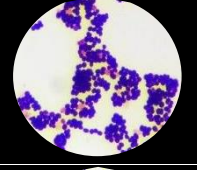

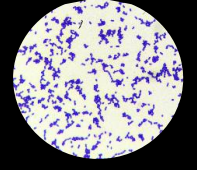

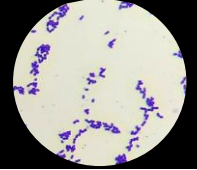
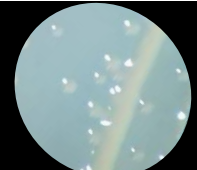
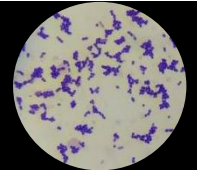

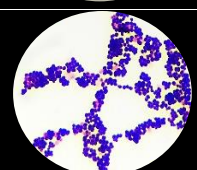

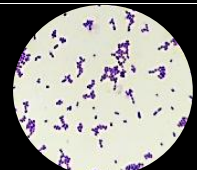

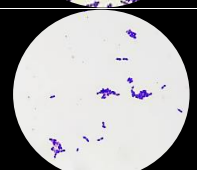
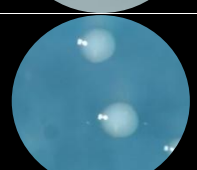
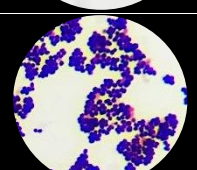
**Tabla 5-1.** Características macroscópicas y microscópicas de aislados bacterianos seleccionados<sup>5</sup>

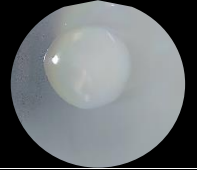


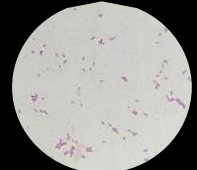
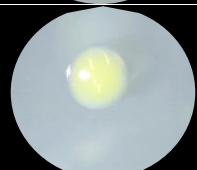

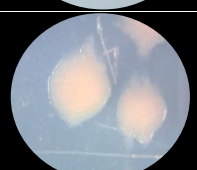
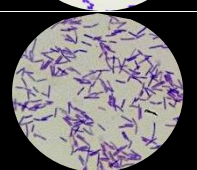
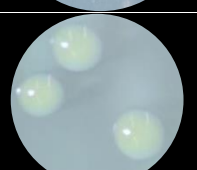
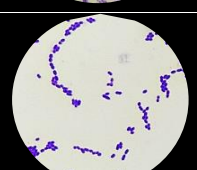
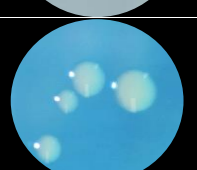
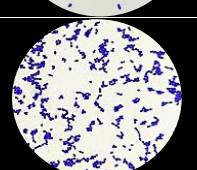
Biotipo (procedencia)	Estadio	Código	Coloración de gram	Aspecto colonia	Aspecto microscópico
	Huevos	CE1C1	Cocos gram +		
		CE1C3	Bacilos gram -		
		CE1C4	Bacilos gram +		

<sup>5</sup> La caracterización macroscópica de los aislados bacterianos se realizó en medio LB sólido a las 24 horas de incubación a 37°C. La descripción de la morfología bacteriana se realizó bajo coloración de gram a un aumento de 100X.

Maíz		CE1C5	Cocos gram +		
		CE1C6	Bacilos gram +		
		CE2C4	Cocos gram +		
		CE2C1	Cocos gram +		
		CE4C3	Cocos gram +		
		CE2C6	Bacilos gram +		
	Larvas jóvenes	CYL1C2	Cocos gram +		
		CYL2C1	Cocos gram +		
		CYL2C2	Cocos gram +		
	Larvas jóvenes	CYL2C4	Bacilos gram +		

Maíz	Larvas tardías	CLL1C1	Cocos gram +		
		CLL1C5	Cocos gram positivos		
		CLL1C8	Bacilos gram positivos cortos		
		CLL2C2	Cocos gram +		
Maíz	Pupas	CP1C2	Cocos gram +		
		CP6C7	Bacilos gram +		
Maíz	Adultos machos	CFA1C1	Cocos gram +		
		CFA2C2	Cocos gram +		
		CMA5C2	Cocos gram +		

	Adultos hembras	CMA5C4	Bacilos gram +			
Arroz	Huevos	RE1C4	Cocos gram +			
		RE3C2	Cocos gram +			
	Larvas jóvenes	RYL1C3	Cocos gram +			
		RYL1C2	Cocos gram +			
		RYL2C5	Cocos gram +			
	Larvas tardías	RLL1C1	Cocos gram +			
		RLL1C4	Cocos gram +			
			RLL1C6	Cocos gram +		

Arroz	Larvas tardías	RLL1C7	Bacilos gram -		
		RLL2C5	Bacilos gram -		
	Pupas	RP1C1	Cocos gram +		
		RP1C3	Bacilos gram +		
		RP3C1	Cocos gram +		
	Adulto macho	RMA1C2	Cocos gram +		

### 5.2.2 Caracterización taxonómica de los aislados bacterianos

El análisis de las secuencias parciales del gen ribosomal 16S de las bacterias seleccionadas reveló que la comunidad cultivable estaba conformada principalmente por miembros de los phyla Firmicutes y Proteobacterias. En sacos de huevos y tejido intestinal de larvas tardías del biotipo maíz se lograron aislar dos miembros del phylum Actinobacteriota. El género *Enterococcus* fue el predominante en ambos biotipos, encontrándose presente en muestras de todas las fases de desarrollo del insecto tanto en el biotipo maíz como arroz. Los géneros *Bacillus* y *Staphylococcus* también estuvieron presentes en ambos biotipos. Se encontraron *Pediococcus*, *Cellulomonas*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Terribacillus*, *Curtobacterium* y *Leclercia* solo en el biotipo maíz; mientras que los géneros *Enterobacter*, *Carnobacterium* y *Planococcus* fueron exclusivos del biotipo

arroz (tabla 5-2). En la tabla 5-2 también se observa un cambio en la composición bacteriana durante las diferentes fases del desarrollo de cada biotipo de *S. frugiperda*, es evidente que la abundancia es mayor en estadio de huevo y se va reduciendo en estadio de adulto. Para la generación de los dendrogramas bayesianos se incluyeron veinticinco secuencias que cumplieran con el criterio de tener por lo menos 1000 pb de longitud a partir de las secuencias del ADNr 16S (figura 5-3). Se construyó además un dendrograma con secuencias del gen *gyrB* de seis aislados seleccionados con el fin de confirmar la identificación a nivel de especie (figura 5-4). Se utilizaron secuencias de la base de datos del GenBank como referencias para los análisis. Se incluyó como *outgroup* para el dendrograma basado en el ADNr 16S la secuencia de la archa *Sulfolobus sp.*, y para el dendrograma basado en *gyrB* la secuencia de la bacteria *Bifidobacterium longum*.

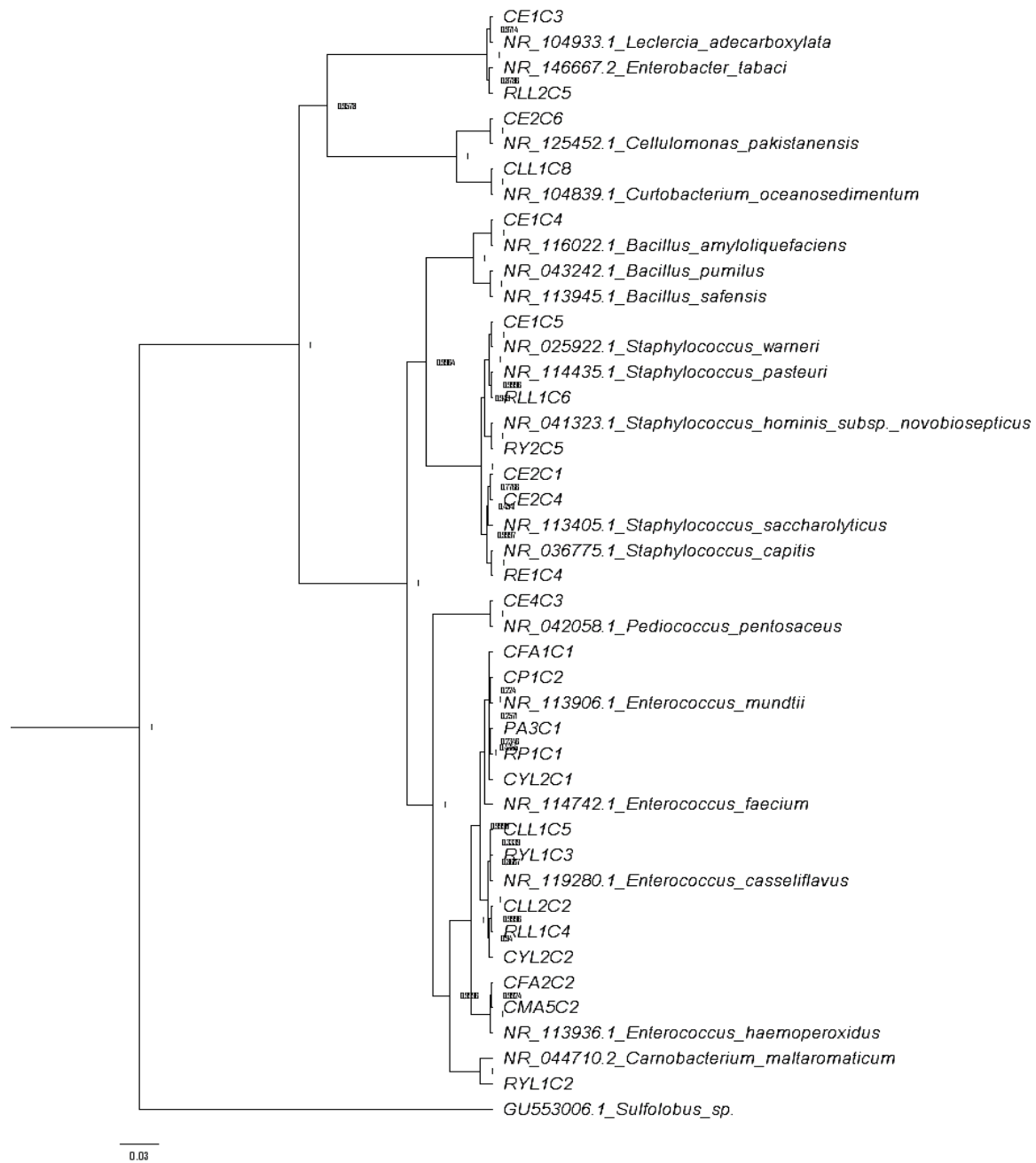
**Tabla 5-2.** Identificación de aislados bacterianos de dos biotipos de *S. frugiperda* de acuerdo con su similitud con secuencias del ADNr 16S.

Biotipo	Código	Estadio	Afiliación filogenética	Phylum	% similitud	
Maíz	CFA1C1	Adulto hembra	<i>Enterococcus mundtii</i>	Firmicutes	99.4	
	CFA2C2		<i>Enterococcus haemoperoxidus</i>		99.6	
	CE1C1	Huevos	<i>Enterococcus mundtii</i>	Firmicutes	99.7	
	CE4C3		<i>Pediococcus pentosaceus</i>		99.7	
	CE1C4		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		99.2	
	CE1C5		<i>Staphylococcus warneri</i>		99.7	
	CE1C6		<i>Bacillus pumilus</i>		99.5	
	CE2C4		<i>Staphylococcus epidermidis</i>		99.6	
	CE2C1		<i>Staphylococcus epidermidis</i>		99.8	
	CE2C6		<i>Cellulomonas pakistanensis</i>		Actinobacteriota	99.3
	CE1C3		<i>Leclercia adecarboxylata</i>		Proteobacteria	99.7
	CYL2C4	Larvas jóvenes	<i>Paenibacillus urinalis</i>	Firmicutes	99.1	
	CYL1C2		<i>Enterococcus casseliflavus</i>		97.7	
	CYL2C1		<i>Enterococcus mundtii</i>		99.1	
	CYL2C2		<i>Enterococcus casseliflavus</i>		98.8	
	CLL1C1	Larvas tardías	<i>Enterococcus mundtii strain</i>	Firmicutes	100.0	
	CLL1C5		<i>Enterococcus casseliflavus</i>		100.0	
	CLL2C2		<i>Enterococcus casseliflavus</i>		99.7	
	CLL1C8		<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	Actinobacteriota	99.7	
	CP6C7	Pupas	<i>Lysinibacillus chungkukjangi</i>	Firmicutes	100.0	
CP1C2	<i>Enterococcus mundtii</i>		99.6			
CMA5C2	Adultos macho	<i>Enterococcus haemoperoxidus</i>	Firmicutes	98.7		

	CMA5C4		<i>Terribacillus halophilus</i>		99.3
	RE1C4	Huevos	<i>Staphylococcus capitis</i>	Firmicutes	99.7
Arroz	RYL1C2	Larvas jóvenes	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	Firmicutes	96.9
	RYL1C3		<i>Enterococcus casseliflavus</i>		99.9
	RYL2C5		<i>Staphylococcus hominis</i>		99.8
	RLL1C6	Larvas tardías	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	Firmicutes	99.8
	RLL1C1		<i>Enterococcus mundtii</i>		98.8
	RLL1C4		<i>Enterococcus casseliflavus</i>		99.8
	RLL1C7		<i>Enterobacter tabaci</i>	99.4	
	RLL2C5		<i>Enterobacter tabaci</i>	Proteobacteria	98.5
	RP1C1	Pupas	<i>Enterococcus mundtii</i>	Firmicutes	99.9
	RE3C2		<i>Planococcus massiliensis</i>		98.3
RP1C3	<i>Bacillus infantis</i>		99.7		
RP3C1	<i>Enterococcus mundtii</i>		99.8		
	RMA1C2	Adulto macho	<i>Enterococcus mundtii</i>	Firmicutes	100.0

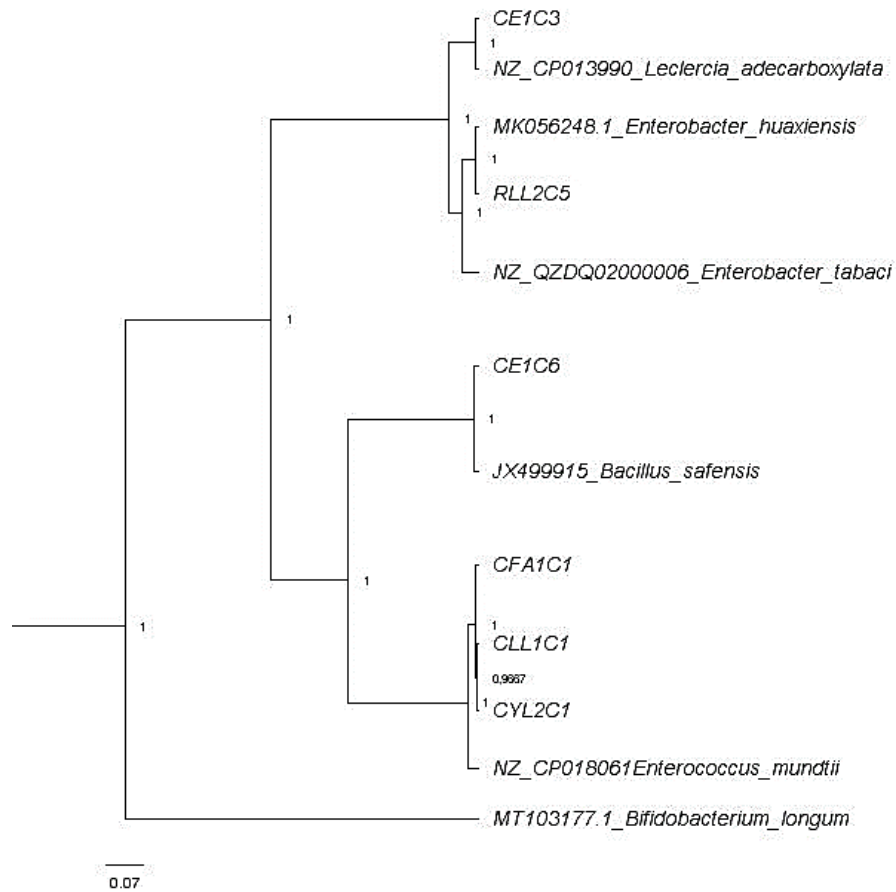


**Figura 5-3.** Dendrograma de inferencia bayesiana para secuencias parciales del ADNr 16S de bacterias de *S. frugiperda*<sup>6</sup>



<sup>6</sup>Para la construcción del dendrograma se utilizó el modelo de sustitución nucleotídica HKY (Hasegawa, Kishino y Yano) (Hasegawa et al. 1985) en el programa Beast. Los aislados bacterianos se representan con los códigos asignados. Las secuencias del GenBank aparecen marcadas con el código de acceso e identidad. Los números en los nodos corresponden a la probabilidad posterior.

**Figura 5-4.** Dendrograma de inferencia bayesiana para secuencias parciales del gen *gyrB* de bacterias de *S. frugiperda*<sup>7</sup>

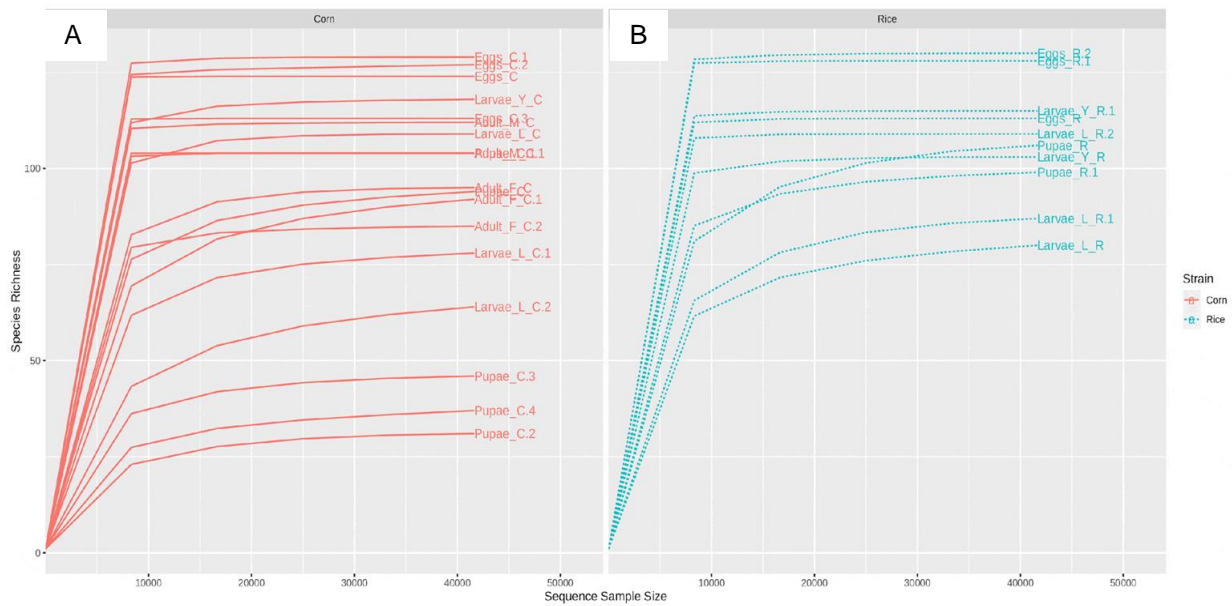


<sup>7</sup> Para la construcción del dendrograma se utilizó el modelo de sustitución GTR (General time reversible) (Tavare, 1986) con distribución gamma en el programa Beast. Los aislados bacterianos se representan con los códigos asignados. Las secuencias del GenBank aparecen marcadas con el código de acceso e identidad. Los números en los nodos corresponden a la probabilidad posterior.

### 5.3 Análisis de las comunidades microbianas mediante Secuenciación masiva de Nueva Generación- NGS

Se llevó a cabo la identificación del perfil del microbioma bacteriano de 28 muestras de tejidos de *S. frugiperda* biotipos maíz y arroz de dos poblaciones de Colombia. Un total de 7,674.095 *reads* asignados a 7987 ASVs con una identidad superior al 97% fueron obtenidos. Después de ser removidas las secuencias quiméricas y los ASVs de abundancias menores a 0.0001%, permanecieron 4,023.896 *reads* con un promedio de 143.710 *reads* por muestra.

**Figura 5-5.** Curvas de rarefacción<sup>8</sup>



Se removieron 370 ASVs de baja abundancia basada en la prevalencia y un total de 23 ASVs de baja varianza basados en el IQR (rango intercuartil). El índice Good's coverage

<sup>8</sup> Las curvas fueron obtenidas a partir del análisis de Chao1 utilizando secuencias parciales del ADNr 16S de dos biotipos de *S. frugiperda* de dos poblaciones de Colombia. Se realizó una normalización de los datos con respecto a la muestra con menor número de *reads*. Los datos normalizados fueron usados en los análisis de diversidad. Corn: biotipo maíz, Rice: biotipo arroz, Adult\_F: hembras adultas, Adult\_M: machos adultos, Eggs: huevos, Larvae\_Y: larvas jóvenes. Larvae\_L: larvas tardías, Pupae: pupas.

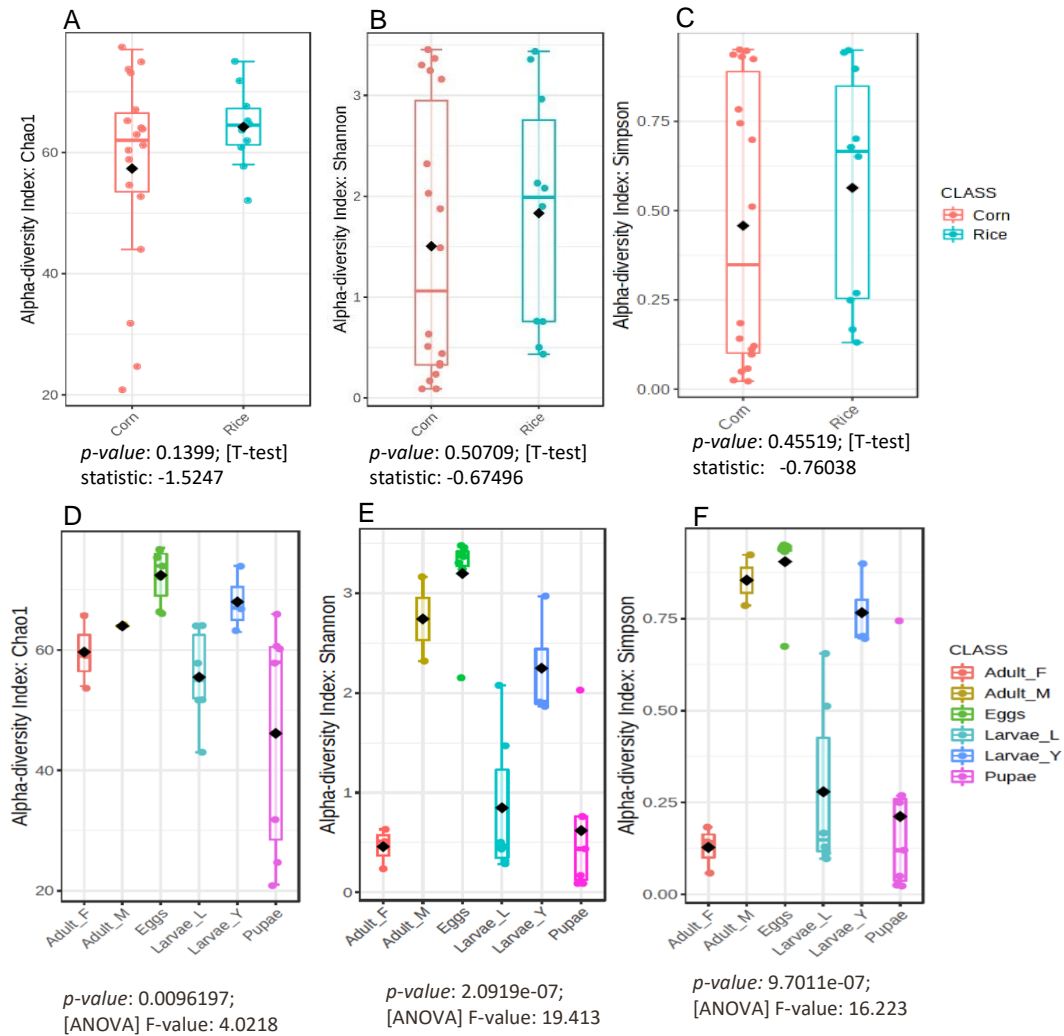
para todas las muestras estuvo por encima de 99,9 indicando que la integridad de la secuenciación fue buena y que hay una adecuada representación de las especies en todas las muestras (tabla suplementaria C-2). El análisis de rarefacción mostró una profundidad adecuada para cada muestra con respecto al número de *reads* para los análisis de alfa y beta diversidad (figura 5-5).

### 5.3.1 Diversidad de las comunidades bacterianas en *S. frugiperda* biotipos arroz y maíz

La alfa-diversidad bacteriana fue medida a través de los índices de Chao1, Shannon y Simpson para muestras de tejido intestinal de estadios larvarios y adultos, así como para tejidos de huevos y pupas de acuerdo con los dos biotipos del insecto. No se encontraron diferencias en los valores de la alfa-diversidad dada por los índices de Chao1, Shannon y Simpson entre los biotipos maíz y arroz de *S. frugiperda* ( $P > 0.05$ ) (figuras 5-6 A, B y C). En contraste, cuando se comparan las poblaciones bacterianas entre las fases de desarrollo del insecto se observan diferencias significativas en los tres índices medidos (Chao1: [ANOVA]  $F = 4.0218$ ,  $p = 0.0096197$ ; Shannon: [ANOVA]  $F = 19.413$ ,  $p = 2.0919e-07$  y Simpson: [ANOVA]  $F = 16.223$ ,  $p = 9.7011e-07$ ), con los valores más altos en muestras de huevos (Eggs) y adultos machos (Adult\_M), en comparación con los valores más bajos en muestras de pupas (Pupae) (figuras 5-6 D, E y F; tabla suplementaria C-2).

El Análisis de Coordenadas principales (PCoA) basado en el análisis de disimilitud Bray-Curtis indicó que no existen diferencias significativas en la composición de los ASVs bacterianos entre las muestras del biotipo maíz y el biotipo arroz ([PERMANOVA]  $F = 0.076874$ ; R-squared: 0.002948;  $p < 0.977$ ), (figura 5-7 A).

**Figura 5-6.** Medidas de diversidad alfa (intra-diversidad) de la composición bacteriana usando ASVs en diferentes fases de desarrollo de dos biotipos de *S. frugiperda* en Colombia<sup>9</sup>.

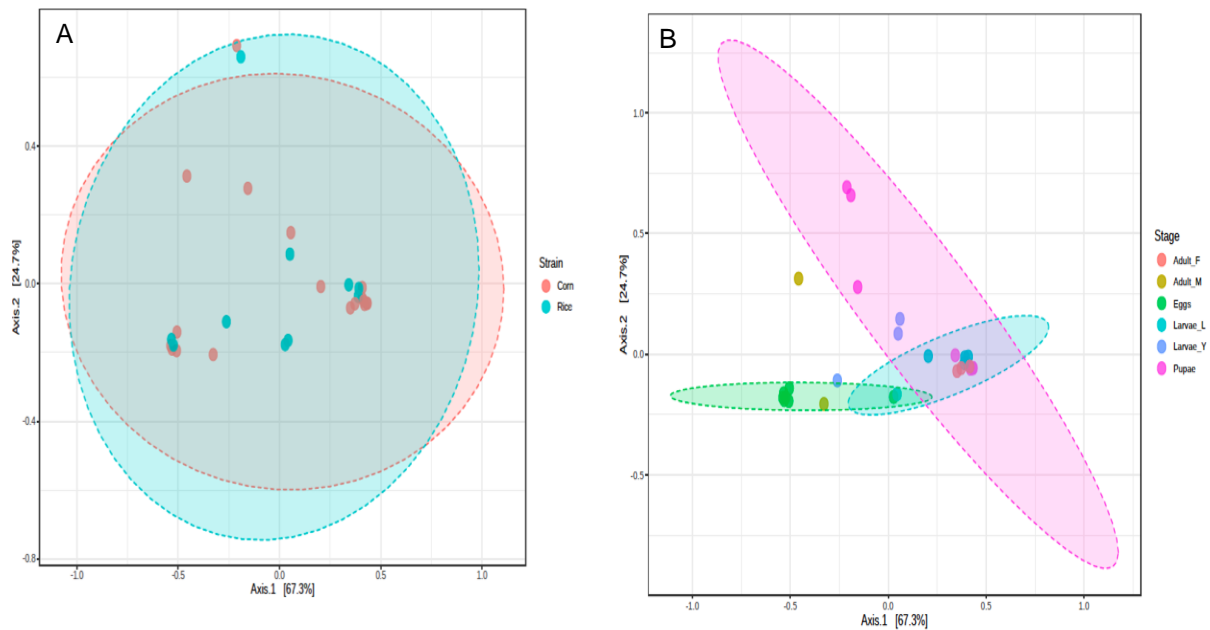


Sin embargo, se observó que la composición de ASVs varía significativamente entre muestras de diferentes fases de desarrollo del insecto ([PERMANOVA] F: 6.9355; R-

<sup>9</sup> La riqueza de especies fue evaluada por A. El índice de Chao1 (estima la diversidad a partir de datos de abundancia), B. índice de Shannon-Wiener (suma de logaritmos de proporción de individuos de las especies) y C. índice de Simpson. Un mayor valor en cada índice, indica una composición bacteriana más rica y más diversa. Corn: biotipo maíz, Rice: biotipo arroz, Adult\_F: hembras adultas, Adult\_M: machos adultos, Eggs: huevos, Larvae\_Y: larvas jóvenes. Larvae\_L: larvas tardías, Pupae: pupas.

squared: 0.61184;  $p < 0.001$ ) (Figura 5-7 B). Lo anterior, se puede también observar al analizar el dendrograma generado a partir de los ASVs de todas las muestras a nivel de género, en donde se aprecia que no hay una agrupación de acuerdo con el biotipo, sino que las muestras tienden a agruparse por fase de desarrollo (figuras 5-8).

**Figura 5-7.** Análisis de  $\beta$ -diversidad (entre grupos) de las comunidades bacterianas asociadas con los grupos de muestras de *S. frugiperda* por biotipo (A) y fase de desarrollo (B)<sup>10</sup>

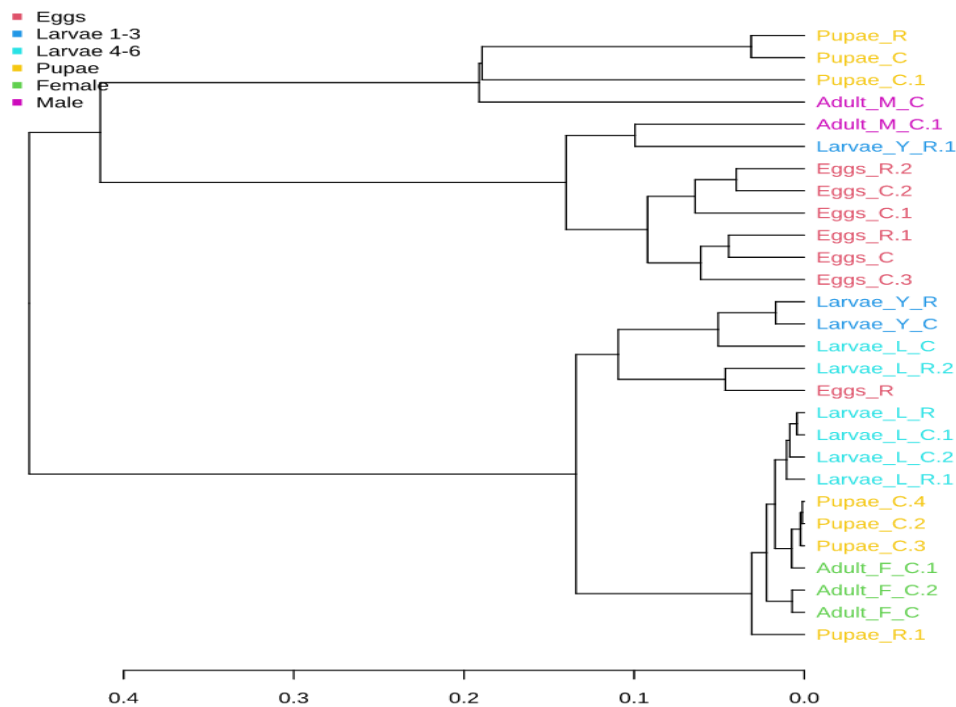


<sup>10</sup> Análisis de Coordenadas principales (PCoA) basados en el análisis de disimilitud Bray-Curtis con ASVs a nivel de género por A. Biotipos ([PERMANOVA] F: 0.076874; R-squared: 0.002948;  $p < 0.977$ ) y B. Fases de desarrollo ([PERMANOVA] F: 6.9355; R-squared: 0.61184;  $p < 0.001$ ). Corn: biotipo maíz, Rice: biotipo arroz, Adult\_F: hembras adultas, Adult\_M: machos adultos, Eggs: huevos, Larvae\_Y: larvas jóvenes. Larvae\_L: larvas tardías, Pupae: pupas.

### 5.3.2 Composición del microbioma bacteriano asociado a los biotipos de *S. frugiperda*

Se encontró que la microbiota bacteriana de *S. frugiperda* estaba distribuida en diez phyla: Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidota, Actinobacteriota, Cyanobacteria, Campilobacterota, Desulfobacterota, Deferribacterota, Acidobacteriota y Verrucomicrobiota. Todos los phyla fueron encontrados en la totalidad de las muestras independiente del biotipo o de la fase de desarrollo, a excepción del phylum Acidobacteriota que solo estuvo en muestras de huevos, larvas jóvenes y adultos machos.

**Figura 5-8.** Dendrograma a nivel de género de muestras de diferentes fases de desarrollo de *S. frugiperda* biotipos maíz y arroz<sup>11</sup>.



<sup>11</sup> El dendrograma fue construido a partir de la medida de divergencia de Jensen-Shannon con el algoritmo de agrupamiento promedio. Las muestras del biotipo maíz van demarcadas con una "C" y las del biotipo arroz con una "R" al final de la denominación. Adult\_F: hembras adultas, Adult\_M: machos adultos, Eggs: huevos, Larvae\_Y: larvas jóvenes. Larvae\_L: larvas tardías, Pupae: pupas.

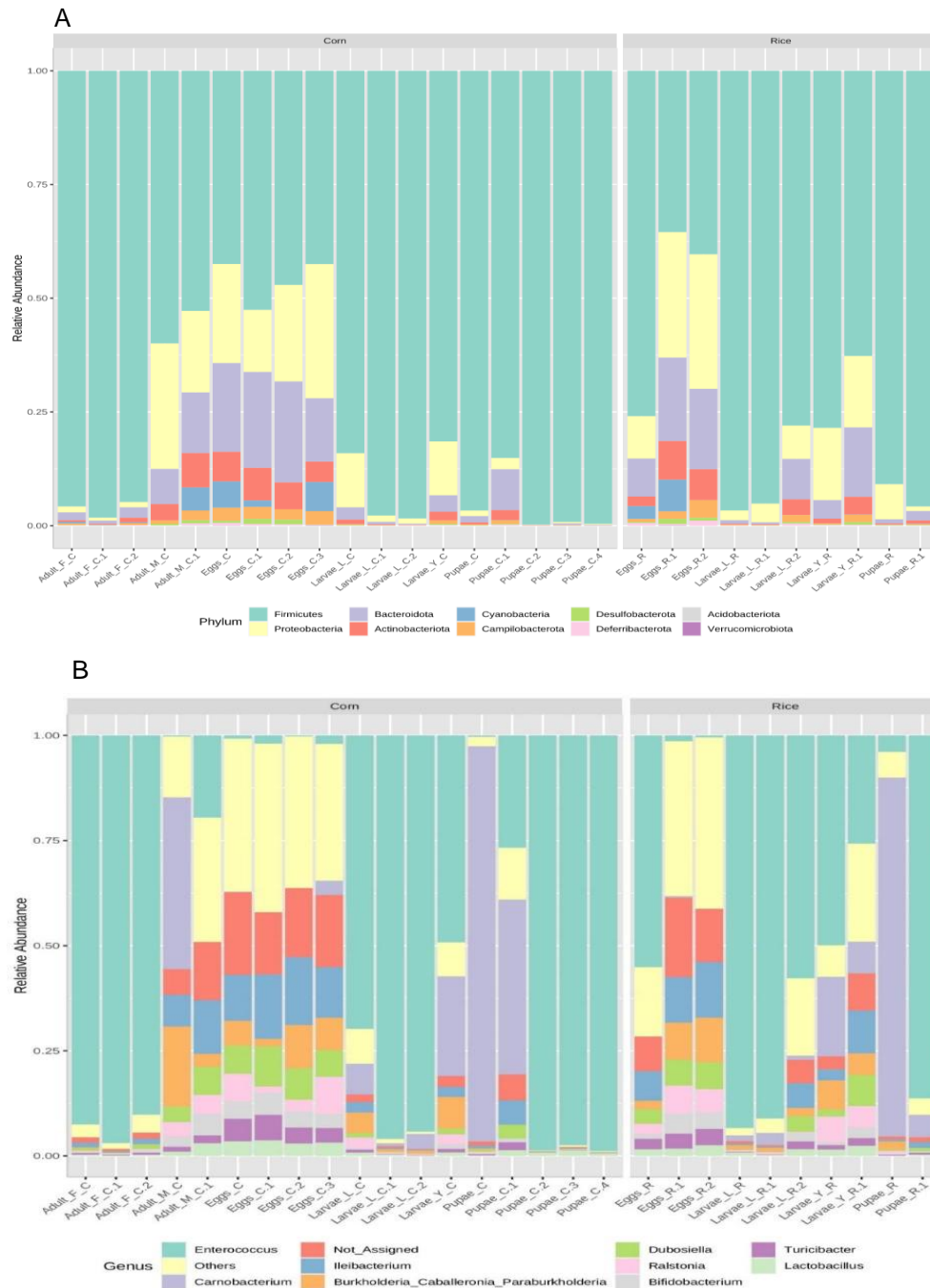
El phylum más abundante fue Firmicutes, con una abundancia relativa del 75% y 79% para las muestras del biotipo arroz y maíz respectivamente; seguido de Proteobacteria (12% en el biotipo arroz y 9% en el biotipo maíz) y Bacteroidota (8% en el biotipo arroz y 7% en el biotipo maíz) (figuras suplementaria C-2 y C-3). En las muestras de huevos y de machos adultos de ambos biotipos el phylum Firmicutes se encuentra en menor proporción frente a los demás estadios; y se va volviendo la población dominante a medida que avanza el desarrollo del insecto, encontrándose hasta en un 99% en algunas muestras de pupas (Figura 5-9).

La mayor riqueza de ASVs se presenta en muestras de huevos de los dos biotipos (figura 5-5 A y B). Se encontraron un total de 80 géneros, con un predominio de *Enterococcus* en las muestras de estadios larvarios, tanto tempranos como tardíos (Larvae\_Y, Larvae\_Y\_R, Larvae\_L\_C y Larvae\_L\_C) y en las hembras adultas del biotipo maíz (Adult\_F\_C). La proporción de este género en muestras de huevos fue menor al 5% a excepción de una muestra del biotipo arroz (Eggs\_R). En este tejido el género predominante fue *Illeobacterium* que se encontró en todas las muestras independiente del biotipo. Otros géneros comunes en todas las muestras de huevos fueron *Dobosiella*, *Turcibacter*, *Burkholderia*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Ralstonia*. Los anteriores géneros fueron compartidos con los machos del biotipo maíz (figura 5-9 B, figura suplementaria C4). El género *Carnobacterium* tiene una abundancia alta en pupas de ambos biotipos. *Illeobacterium*, *Ralstonia* y *Burkholderia* tienen abundancias relativas similares entre adultos y huevos con respecto a pupas y larvas.

El mapa de calor generado a partir del análisis de conglomerado jerárquico de los datos de abundancia relativa de los ASVs más prominentes a nivel de género, facilita la identificación de taxones que varían en abundancia en cada muestra. *Enterococcus* fue el género dominante en la mayoría de las muestras, pero la abundancia de esta bacteria cambia en función de la fase del ciclo de vida del insecto, exhibiendo una correlación negativa en muestras de huevos (figura 5-11). Vale la pena resaltar la presencia de *Spiroplasma* en muestras de huevos, larvas jóvenes de ambos biotipos, y de un adulto macho del biotipo maíz (Eggs\_C, Eggs\_R, Larvae\_Y\_C, Larvae\_Y\_R y Adult\_M\_C) (figura 5-10) y *Arsenophonus*, presente en el biotipo maíz en dos muestras de huevos y en una de pupa.

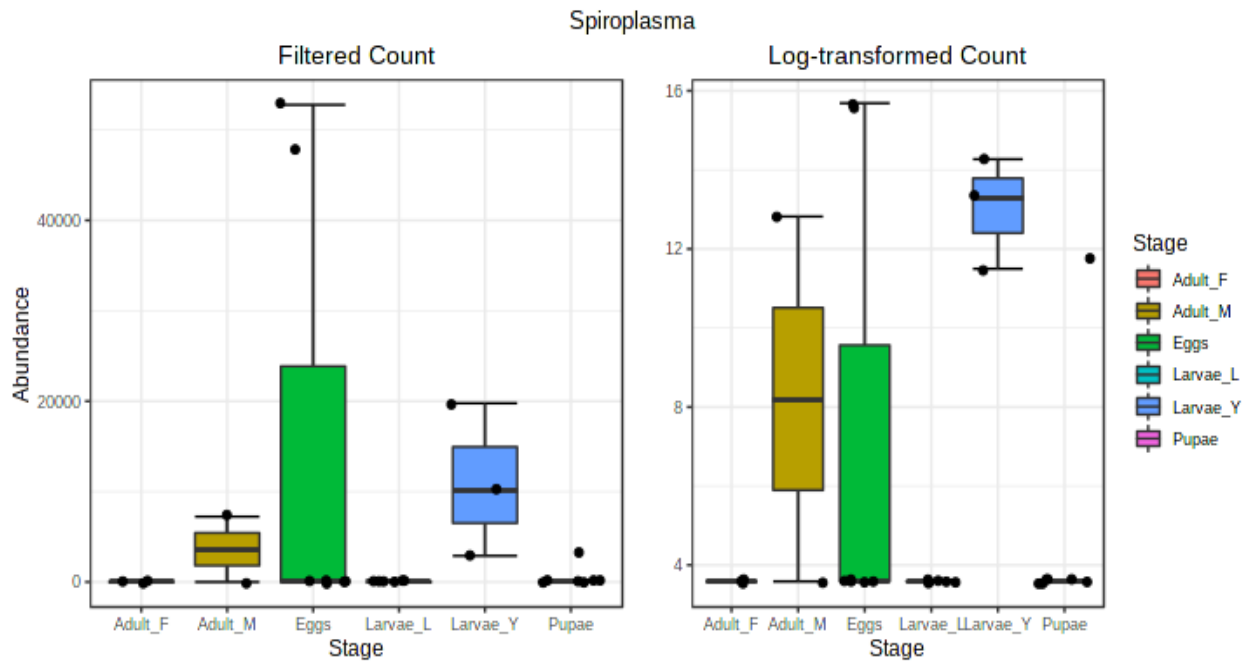


**Figura 5-9.** Composición y diversidad de la microbiota bacteriana de varias fases de desarrollo de *S. frugiperda* de acuerdo con el biotipo<sup>12</sup>.



<sup>12</sup> Abundancia relativa de ASVs de acuerdo al rango taxonómico de A. phylum y B. género. Se muestran los ASV con abundancias superiores al 1%. Adult\_F: hembras adultas, Adult\_M: machos adultos, Eggs: huevos, Larvae\_Y: larvas jóvenes. Larvae\_L: larvas tardías, Pupae: pupas.

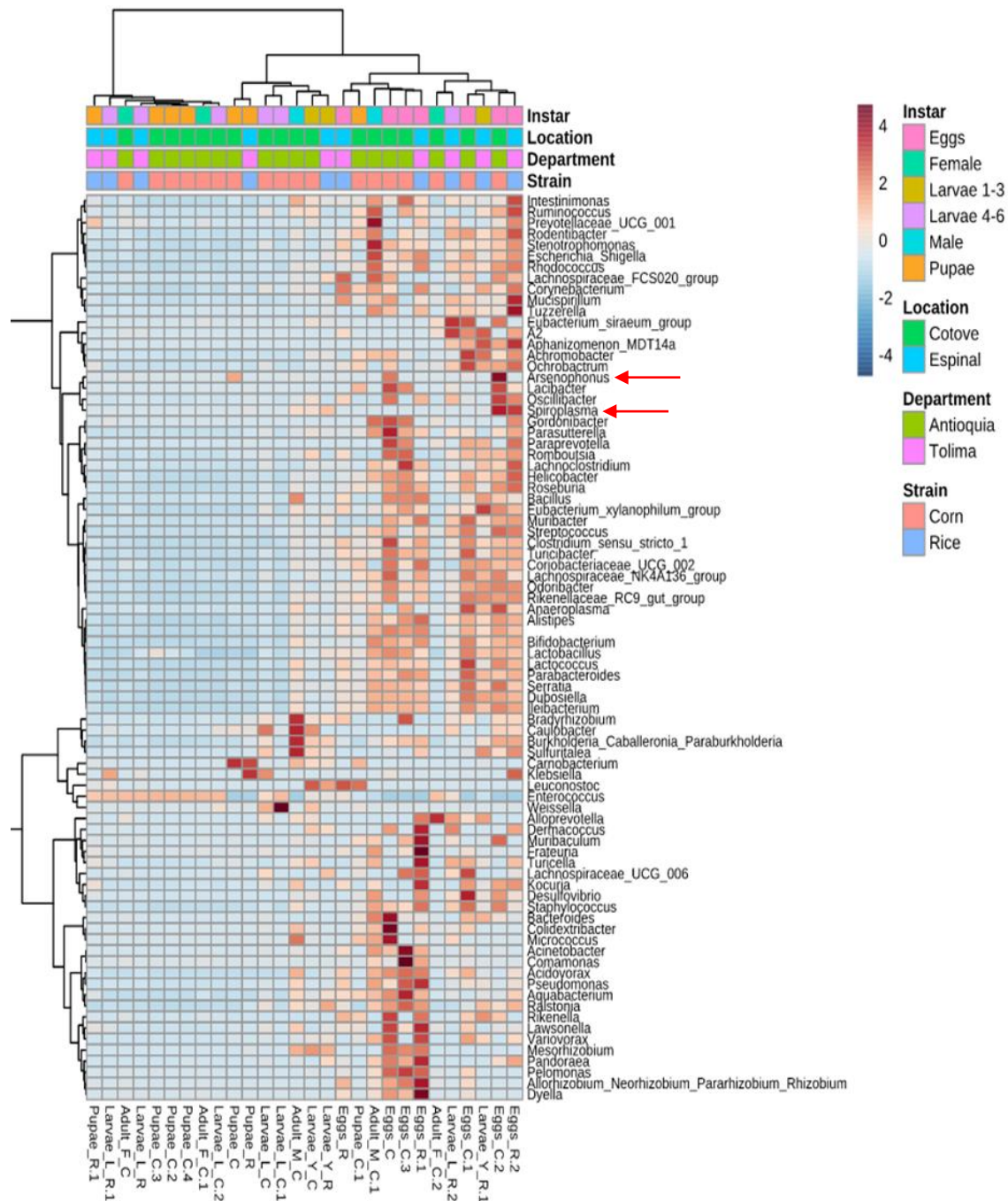
**Figura 5-10.** Abundancia relativa de *Spiroplasma* en muestras de diferentes fases de desarrollo de *S. frugiperda*.



Por otro lado, uno de los resultados más interesante en cuanto a la microbiota de los biotipos de *S. frugiperda*, lo reflejó el Análisis Discriminante Lineal (LDA) junto con mediciones del tamaño del efecto LEfSe (effect size measurements) puesto que éste, reveló diferencias a nivel de género en la composición del microbioma bacteriano entre los biotipos, con una abundancia diferencial significativa para 8 géneros de bacterias entre las muestras de los biotipos arroz y maíz ( $p\text{-value} < 0.05$ , LDA score  $\geq 2.0$ ) (figura 5-12 A).

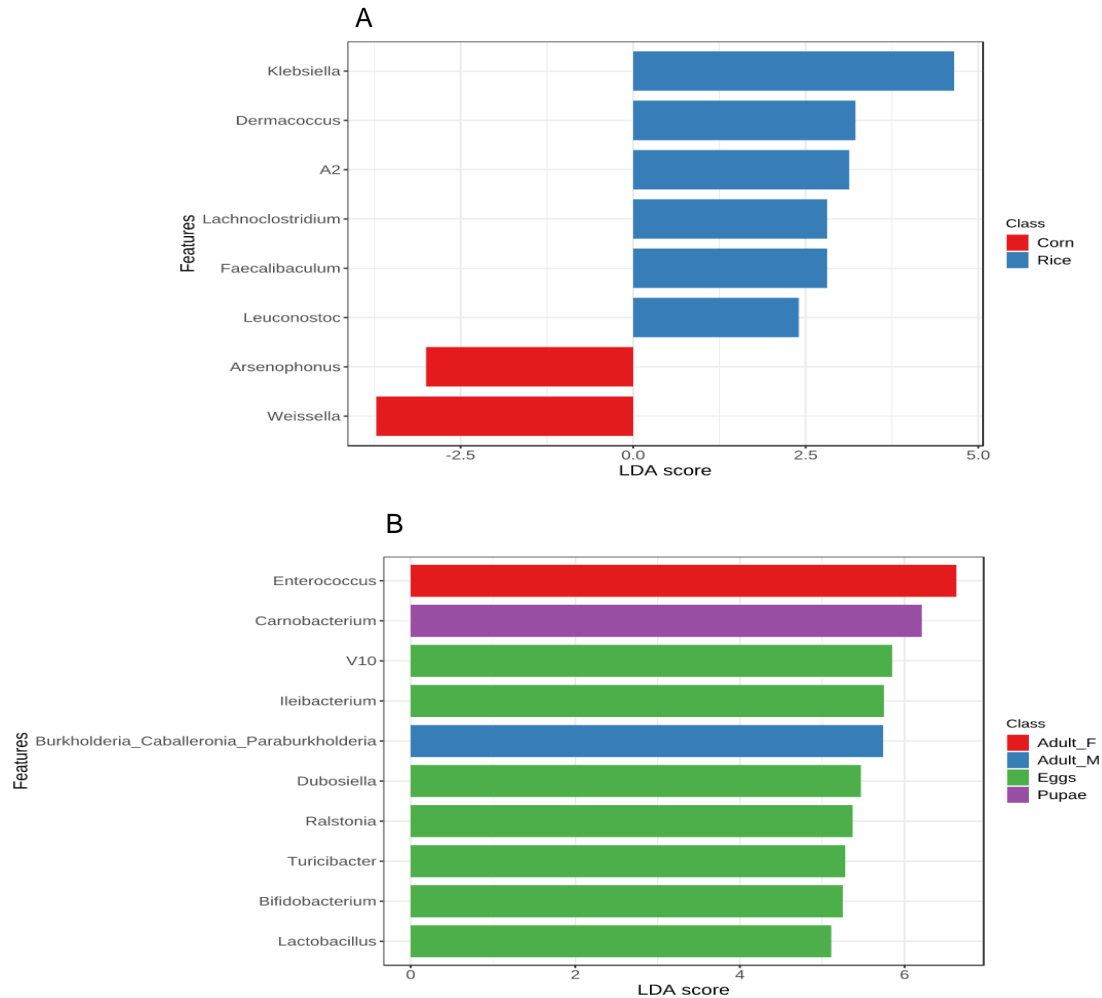
*Klebsiella*, *Dermacoccus*, A2 (familia Lachnospiraceae), *Lachnoclostridium*, *Faecalibaculum* y *Leuconostoc* fueron los géneros más representados en el biotipo arroz, mientras que *Arsenophonus* y *Weissella* tuvieron una abundancia mayor en el biotipo maíz (figuras 5-12 A y 5-13). Cuando el análisis LEfSe se realizó tomando como clase las fases de desarrollo del insecto, se logró determinar que *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Ileibacterium* y *Bukholderia* eran los géneros predominantes en muestras de hembras adultas (Adult\_F), pupas, huevos y machos adultos (Adult\_M) respectivamente (figura 5-12 B).

**Figura 5-11.** Análisis de agrupamiento jerárquico de ASVs a nivel de género en muestras de diferentes fases de desarrollo de *S. frugiperda* biotipos arroz y maíz<sup>13</sup>



<sup>13</sup> Mapa de calor basado en el coeficiente de correlación de Pearson de la abundancia de taxones microbianos. Los colores rojo y azul representan correlaciones positivas y negativas, respectivamente. La escala de colores representa la abundancia escalada de cada variable, indicada como puntuación Z, el rojo indica abundancia alta y el azul indica abundancia baja.

**Figura 5-12.** Análisis lineal discriminante (LDA) tamaño del efecto (LEfSe) de la microbiota bacteriana de *S. frugiperda* por biotipo (A) y fase de desarrollo (B).

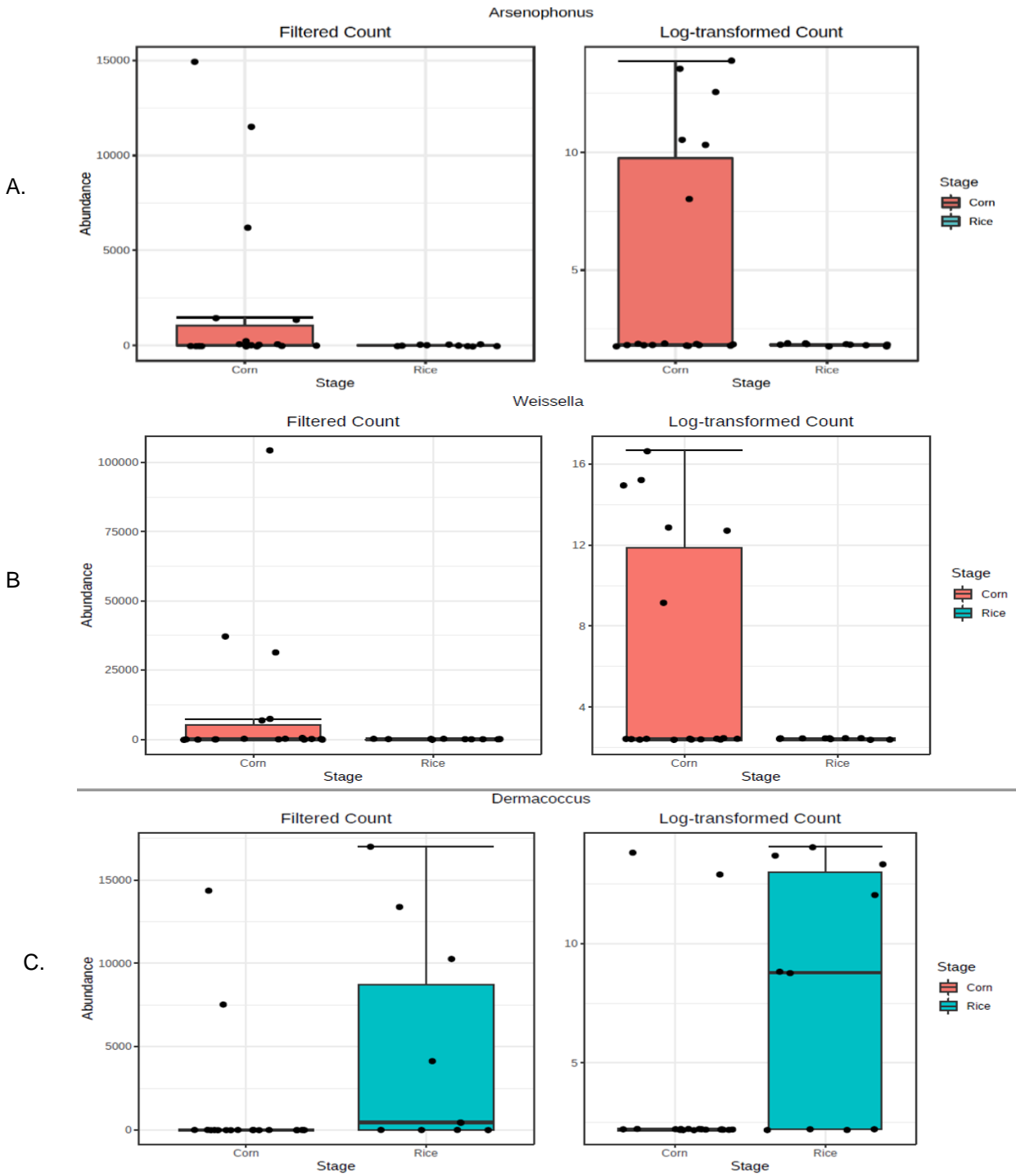


Adicionalmente, se realizó un análisis de correlación de patrones a nivel de género, utilizando el método de correlación de rangos de Spearman como método de medición de distancias. En la figura 5-14 se muestra el listado de géneros con correlación positiva y negativamente con los biotipos maíz y arroz. Es interesante notar que, dentro del listado, *Spiroplasma* se correlaciona positivamente con el biotipo arroz y negativamente con el biotipo maíz, mientras que *Arsenophonus* se correlaciona positivamente con el biotipo maíz y negativamente con el biotipo arroz.

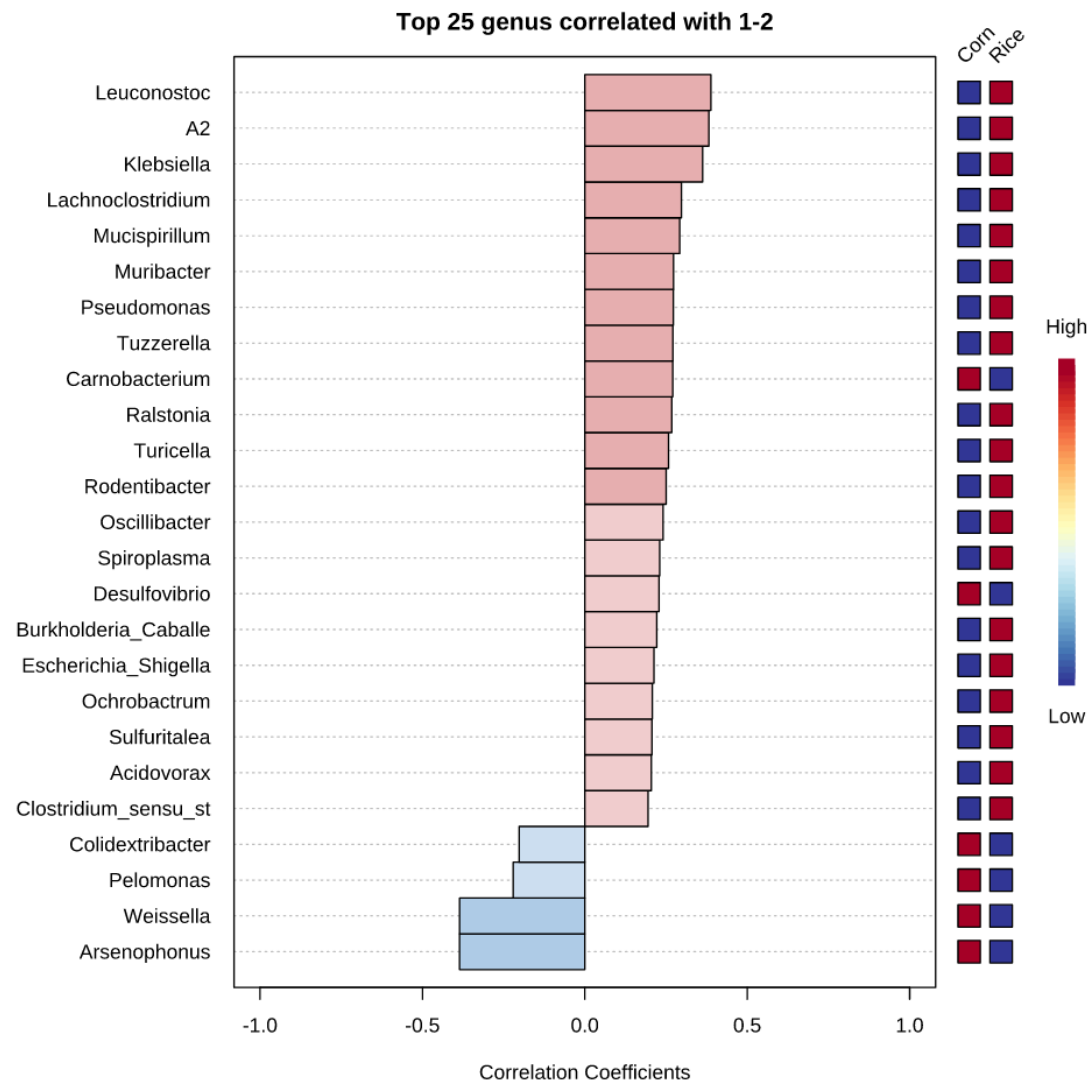
Se realizó un análisis para determinar el “núcleo microbiano” de las muestras del biotipo arroz (RS) y maíz (CS) de forma independiente, con el fin de determinar los taxones presentes en una alta fracción de las muestras estudiadas. Se tuvieron en cuenta los ASVs con una abundancia relativa  $>0.01\%$  y una prevalencia  $>30\%$  para la construcción de los mapas de calor. De quince ASVs, doce estuvieron presentes tanto en el core bacteriano del arroz como en maíz. Los ASVs comunes a los dos biotipos con los umbrales mencionados pertenecían a los phyla Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteriota y Bacteroidota. El género que predominó en ambos biotipos fue *Enterococcus* con una prevalencia mayor al 90% en las muestras del biotipo arroz y al 80% en las muestras del biotipo maíz. *Carnobacterium* e *Illeobacterium* tuvieron una prevalencia del 70% en R (arroz) y 38% y 61% respectivamente en C (maíz). Los géneros *Dubosiella*, *Turicibacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Ralstonia*, *Burkholderia* y *Bifidobacterium* fueron comunes entre los biotipos con prevalencias entre el 30 y el 60% (tabla 5-3, figura 5-15 A y B).

Se ejecutó además el análisis teniendo en cuenta la totalidad de las muestras de los biotipos arroz y maíz y de las diferentes fases de desarrollo, y se encontró que con una prevalencia  $>50\%$  y una abundancia relativa  $>0,02\%$  el núcleo microbiano en muestras de ambos biotipos estaba conformado por los géneros *Enterococcus* e *Illeobacterium* (figura 5-15 C).

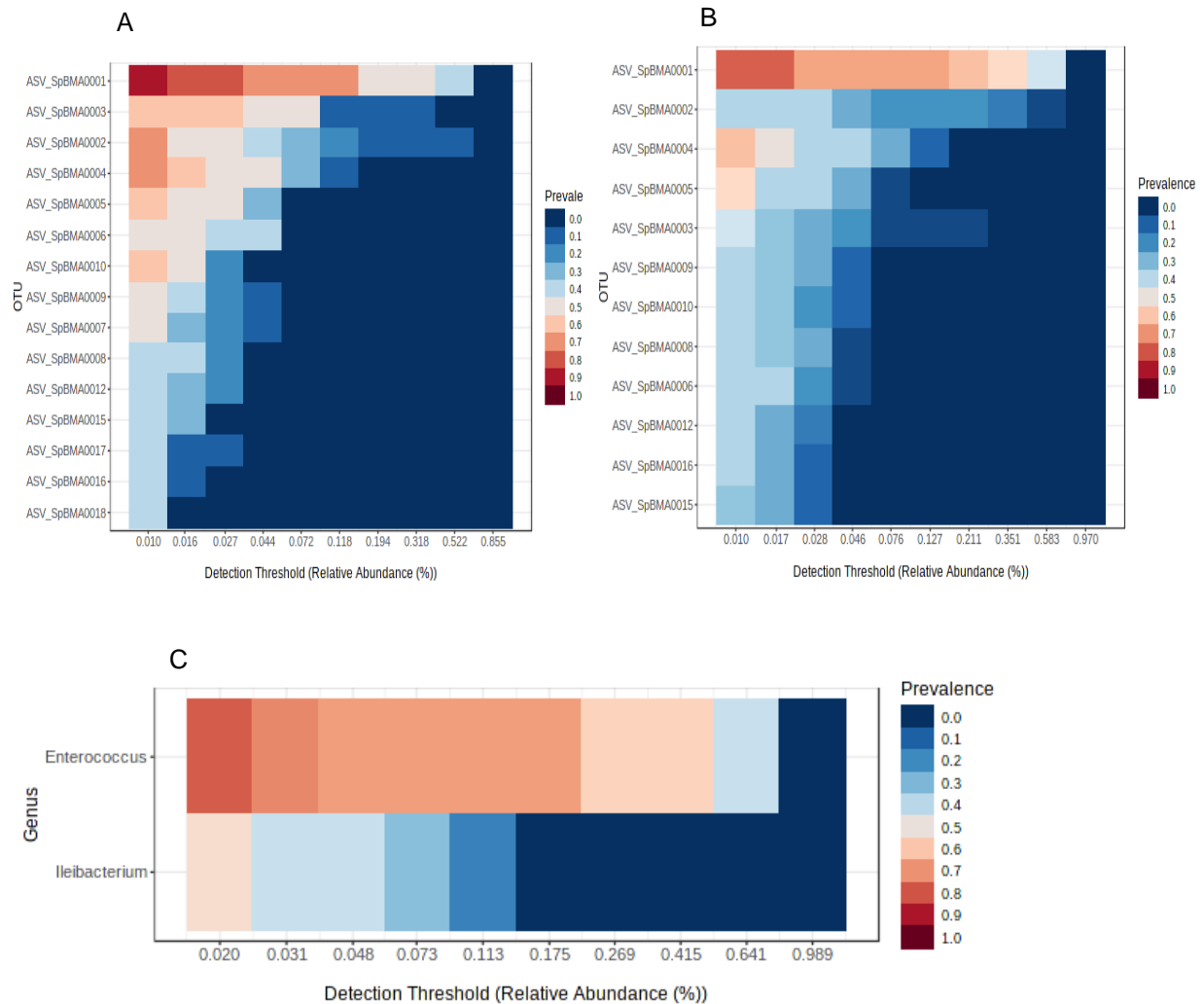
**Figura 5-13.** Abundancia relativa de tres géneros de bacterias en los biotipos maíz y arroz de *S. frugiperda* en Colombia. A. *Arsenophonus*, B. *Weissella* y C. *Dermaococcus*.



**Figura 5-14.** Análisis de correlación de patrones de bacterias de *S. frugiperda* a nivel de género. Se muestra el top 25 de géneros correlacionados con el biotipo maíz (Corn) y el biotipo arroz (Rice). El rojo indica correlación positiva y el azul correlación negativa.



**Figura 5-15.** Análisis de Core microbiano de ASVs de muestras de *S. frugiperda* biotipos arroz (A) y maíz (B) con una abundancia relativa mayor a 0.01%, y un umbral de prevalencia mayor al 30%. C: core microbiano encontrado compartido en los biotipos maíz y arroz con una prevalencia del 50% y abundancia relativa mayor al 0.02%<sup>14</sup>



<sup>14</sup> Mapa de calor en el que se muestra el “core” o núcleo microbiano basado en la abundancia relativa de ASVs (eje X) y prevalencia (eje Y). La variación de la prevalencia de cada ASV se indica de acuerdo a un gradiente de color, desde azul (decreciente) hasta rojo (creciente).



**Tabla 5-3.** Composición del núcleo microbiano de *S. frugiperda* biotipos maíz (CS) y arroz (RS) basado en de ASVs con bundancia relativa mayor a 0.01%, y un umbral de prevalencia mayor al 30%. NA: no asignado.

ASV	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Biotipo		
ASV_SpBMA0001	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	CS-RS		
ASV_SpBMA0003				Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	CS-RS		
ASV_SpBMA0016				Carnobacteriaceae	<i>Carnobacterium</i>	CS-RS		
ASV_SpBMA0002				Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i>	CS-RS		
ASV_SpBMA0015			Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	<i>Ileibacterium</i>	CS-RS		
ASV_SpBMA0004					<i>Dubosiella</i>	CS-RS		
ASV_SpBMA0005					<i>Turicibacter</i>	CS-RS		
ASV_SpBMA0010			Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Ralstonia</i>	CS-RS
ASV_SpBMA0006						<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	RS	
ASV_SpBMA0007							CS-RS	
ASV_SpBMA0008	Enterobacterales	Yersiniaceae			<i>Serratia</i>	RS		
ASV_SpBMA0018	Actinobacteriota	Actinobacteriota	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	<i>Bifidobacterium</i>	CS-RS		
ASV_SpBMA0009	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	NA	CS-RS		
ASV_SpBMA0012	Campilobacterota	Campylobacteria	Campylobacterales	Helicobacteraceae	<i>Helicobacter</i>	RS		
ASV_SpBMA0017								

## 6. Discusión

En este trabajo se exploraron las comunidades bacterianas asociadas a los biotipos arroz (RS) y maíz (CS) de *S. frugiperda*. La identificación de los biotipos se llevó a cabo mediante el uso del marcador Citocromo oxidasa subunidad I, confirmándose una correspondencia del biotipo con el cultivo de procedencia de los especímenes. Esta correspondencia ha sido observada en el Hemisferio Occidental pero no es total, encontrándose en promedio un 20% de larvas provenientes de cultivos de maíz que expresan los marcadores genéticos del biotipo arroz (Nagoshi & Meagher, 2004). La presencia del sitio de reconocimiento CCGG para la enzima de restricción *MspI* en la secuencia de COI, permite la digestión del fragmento preamplificado por PCR solo en individuos del biotipo maíz (Levy et al., 2002), pudiéndose diferenciar como CS las muestras que presentaron digestiones con bandas menores a 500 pb, y ausencia de digestión en muestras del RS. A pesar de que la presencia de híbridos entre los biotipos es relativamente baja (Cañas-Hoyos, Lobo-Echeverri, & Saldamando-Benjumea, 2017; Higueta Palacio et al., 2021; Nagoshi & Meagher, 2003; Vélez-Arango et al., 2008), en este estudio todas las muestras que no presentaron digestión con la enzima *MspI* fueron sometidas a PCR de la región FR, encontrándose en su totalidad la generación de un barrido en la región de alto peso molecular típico del haplotipo RS y ausencia de híbridos (figura 5-1). Estos resultados muestran que los marcadores COI y FR fueron consistentes para la identificación de los biotipos, y que hubo una fuerte correlación entre los resultados obtenidos y la planta hospedante. Si bien existen otros métodos útiles en la diferenciación de los biotipos y algunos trabajos muestran ambigüedades en la correlación de los resultados (Zhang et al., 2019), los marcadores moleculares empleados en este trabajo han mostrado ser adecuados para la identificación de los biotipos en Colombia (Cano-Calle, 2020; Higueta Palacio et al., 2021; Salinas-Hernandez & Saldamando-Benjumea, 2011; Vélez-Arango, Arango, Villanueva, Aguilera, & Saldamando, 2008).

### 6.1 Comunidades bacterianas asociadas a los biotipos de *S. frugiperda*

El ensamblaje de las comunidades microbianas en el intestino es el resultado de la interacción dinámica de factores como la dieta, las condiciones ambientales, la fisiología intestinal y la fase de desarrollo del insecto (Paniagua, Frago, Kaltenpoth, Hilker, &

Fatouros, 2018). Uno de los objetivos de este trabajo fue comparar la diversidad microbiana del tracto gastrointestinal de los biotipos de *Spodoptera frugiperda*. Se sabe que los biotipos de esta especie presentan una predilección por ciertas plantas hospedantes, en donde CS está asociado a maíz, sorgo y algodón; mientras que RS se encuentra mayormente en arroz y pasturas (Meagher, Nagoshi, Stuhl, & Mitchell, 2004; Pashley & Martin, 1987; Pashley, 1986). La composición de las comunidades bacterianas puede cambiar en dependencia de la dieta en varias especies de insectos (Belda et al., 2011; Gayatri Priya, Ojha, Kajla, Raj, & Rajagopal, 2012), o permanecer estable a pesar de variaciones de la misma (Sudakaran, Salem, Kost, & Kaltenpoth, 2012). Nuestros resultados mostraron que la diversidad beta no exhibían una agrupación específica basada en los biotipos (figura 5-7 A). Es importante tener en cuenta que es posible que la composición de la microbiota esté influenciada por el sitio de recolección, ya que el biotipo de maíz es procedente del departamento de Antioquia y el de arroz del Tolima. No obstante, los resultados muestran que ambos comparten microbiota, indicando que los factores geográficos no tuvieron relación con su composición. Estos resultados son similares a los encontrados por Oliveira, Rodrigues, & Cônsoli (2021) quienes estudiaron la microbiota intestinal de larvas silvestres de *S. frugiperda* pertenecientes a los biotipos CS y RS obtenidas de plantas de maíz y arroz de cinco países de América Latina incluyendo Colombia. Los autores encontraron que la microbiota bacteriana no se veía afectada por el biotipo o por la distribución geográfica.

En larvas silvestres de cultivos de maíz de diferentes lugares de Nigeria se encontró que no había diferencias significativas en la diversidad y riqueza de especies bacterianas entre individuos, y que la localización geográfica no era un factor que determinara la composición de la microbiota de las larvas de *S. frugiperda* (Ugwu, Liu, Sun, & Asiegbu, 2020). En Colombia, Higueta- Palacio et al. (2021) compararon la composición de la microbiota de larvas L5 del biotipo maíz del gusano cogollero obtenidas de cultivos de maíz del mismo lugar geográfico, pero en diferentes temporadas. Los autores encontraron un cambio significativo en las comunidades microbianas intestinales de las larvas recolectadas en temporada lluviosa frente a las obtenidas en temporada seca, demostrando la influencia de la estacionalidad sobre la microbiota intestinal de *S. frugiperda*.

Es importante mencionar, que para algunos autores los biotipos de *S. frugiperda* son lo suficientemente disímiles como para ser consideradas dos especies diferentes (Dumas,

Barbut, et al., 2015; Dumas, Legeai, et al., 2015; Juárez et al., 2014). Los simbioses intestinales pueden variar incluso en especies muy relacionadas desde el punto de vista ecológico y genético. Jones et al., (2019) reportaron que larvas de *S. frugiperda* y *Helicoverpa zea*, dos lepidópteros que comparten muchas similitudes biológicas y ecológicas; exhibieron diferencias en las comunidades bacterianas intestinales a pesar de que habían sido recolectados de la misma planta hospedante y del mismo lugar geográfico. Lo anterior, sugiere que existen factores intrínsecos a cada especie de insecto que pueden condicionar la conformación de las comunidades bacterianas en el tracto gastrointestinal. A pesar de que *S. frugiperda* probablemente se encuentra en proceso de especiación y de que existen notables diferencias entre ambos biotipos, nuestros resultados revelan que los cambios a nivel genético y fisiológicos en los biotipos no se vieron reflejados en la conformación de las comunidades bacterianas intestinales bajo nuestras condiciones experimentales.

Sin embargo, al llevar a cabo una inspección más detallada de los datos mediante el Análisis Lineal Discriminante (LDA) junto con mediciones del tamaño del efecto LEfSe, se reveló que existían ciertos taxones que presentaban una abundancia diferencial significativa en CS frente a RS y viceversa. *Klebsiella*, *Dermacoccus*, A2 (familia Lachnospiraceae), *Lachnoclostridium*, *Faecalibaculum* y *Leuconostoc*, fueron los más representados en el RS, mientras que *Arsenophonus* y *Weissella* tuvieron una abundancia significativa en CS (5-12 A y B). Es necesario indagar la relevancia de estos grupos microbianos en trabajos posteriores, en términos de poder establecer su posible rol funcional entre los biotipos.

El análisis de correlación de patrones a nivel de género arrojó como hallazgo llamativo la presencia de ASVs de secuencias de *Arsenophonus* y *Spiroplasma*, (figura 5-14) los cuales se correlacionaron positivamente con CS y RS respectivamente. Se evidenció una correlación negativa diferenciada (*Arsenophonus* presenta correlación negativa con RS y *Spiroplasma* correlación negativa con CS) (figura 5-14). Tanto *Arsenophonus* como *Spiroplasma* son dos simbiontes secundarios intracelulares conocidos por desencadenar diferentes efectos en los insectos hospedantes (Weinert, Araujo-Jnr, Ahmed, & Welch, 2015). Varias especies de lepidópteros son colonizadas por estos endosimbiontes que infectan el tejido reproductivo pudiendo ejercer una manipulación de la fisiología de su hospedante mejorando su transmisión (Dowell, Basham, & McCoy, 1981; Paniagua et al.,

2018; Tabata et al., 2011; Wang et al., 2020). No se encontraron reportes de estos dos endosimbiontes en *S. frugiperda*. En un trabajo paralelo realizado en la Universidad Nacional de Colombia (Sede Medellín), se encontró *Arsenophonus* en tracto digestivo y gónadas de insectos del biotipo maíz. Su presencia fue confirmada por PCR con *primers* específicos para este endosimbionte (Comunicación personal: Castañeda, Cadavid, Saldamando-Benjumea, & Moreno, 2022) La correlación de cada uno de estos endosimbiontes con un biotipo en particular podría tener implicaciones si se desean utilizar como potenciales biocontroladores, pues podrían tener mayor efecto en un biotipo que en otro.

## 6.2 Dinámica de las comunidades microbianas durante el ciclo de vida de *S. frugiperda*

*S. frugiperda* al igual que todos los lepidópteros, presenta una metamorfosis completa en la que sucede una radical reestructuración anatómica del insecto, acompañada de cambios funcionales y de estilo de vida. Dichos cambios pueden impactar severamente la composición de la microbiota durante las diferentes fases de su ciclo biológico (Paniagua et al., 2018). Otro objetivo de esta investigación fue determinar los posibles cambios en la microbiota en cinco momentos o fases del desarrollo de la plaga: huevos, larvas jóvenes, larvas tardías, pupas y adultos (machos y hembras), para lo cual se utilizó la secuenciación de la región V4 del ADNr 16S por la tecnología Illumina MySeq de muestras de intestinos de larvas y adultos, así como de tejidos de huevos y pupas.

Durante la vida silvestre, las hembras de *S. frugiperda* utilizan el envés de las hojas de plantas hospedantes para depositar los sacos de huevos que son recubiertos con escamas de su región abdominal (Rwomushana, 2019). Además de servir de protección frente a las condiciones medio ambientales, las escamas aportan carga microbiana de la madre. Los sacos de huevos se encuentran expuestos al ambiente externo en donde son propensos a la colonización por bacterias ambientales, lo que podría explicar en parte la mayor diversidad en estas muestras. Las bacterias que colonizan superficialmente los huevos pueden eventualmente ingresar al tracto digestivo de la larva durante la eclosión. Chen et al. (2016); documentaron que las larvas de *S. litoralis* para eclosionar deben consumir el corión, convirtiéndose en su primer alimento. Durante el seguimiento del ciclo de vida de *S. frugiperda* se logró observar que ocurre este mismo fenómeno. Las larvas jóvenes

(Larvae\_Y) en consecuencia, pueden presentar una microbiota con una composición similar a los huevos, aunque los cambios en las condiciones dadas por el entorno intestinal podrían modificar la estructura y abundancia de las comunidades microbianas, llevando a una drástica disminución de la riqueza y diversidad de especies con la maduración de la larva (figura 5-9 B).

El incremento en el número de bacterias (UFC/g) cuando el insecto pasa de huevo a larva joven (figura 5-2) puede tener relación con el cambio de condiciones del entorno. El ambiente intestinal proporciona nutrientes, pero a la vez se da competencia por los recursos disponibles. Se observa que paralelamente se produce un decrecimiento en la diversidad en larvas jóvenes con respecto a los huevos (figura 5-6 D, E y F). En larvas tardías (larvae\_L) los recuentos bacterianos vuelven a descender a la par con una franca disminución de la diversidad. En esta etapa los valores corresponden a una diversidad baja de acuerdo con los índices de Shannon-Wiener (0,84) y de Simpson (0,27) (figura 5-6 C, D y E), lo cual es esperado para lepidópteros en los que la anatomía y condiciones del entorno intestinal resultan adversas para la colonización y establecimiento de muchas bacterias (Engel & Moran, 2013).

Al alcanzar la fase pupal (Pupae), se aprecia una disminución en el número de ASVs, llegando a los valores más bajos en todo el ciclo de vida. En esta etapa también se registran los valores más bajos en los índices de relacionados con diversidad y riqueza (figura 5-6 C, D y E y tabla suplementaria C2). Este hallazgo es similar a lo que sucede en *S. littoralis* (Chen et al., 2016), pero contrario a lo reportado en *S. exigua*, en la que las pupas presentan la mayor diversidad durante el ciclo (Gao et al., 2019). En nuestros resultados, llama la atención que en esta fase ocurre un aumento abrupto en el recuento de UFC/g. Posteriormente, al completarse la metamorfosis; vuelven a bajar los títulos de UFC/g al emerger los adultos (figura 5-2). Estudios en las polillas *Manduca sexta* y *Helicoverpa armigera* han revelado un incremento en la producción de lisozima antes y durante la metamorfosis (Russell & Dunn, 1996; Y. Zhang et al., 2009). Esta enzima es reconocida por catalizar la hidrólisis de las uniones beta 1,4 entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina del peptidoglicano, componente mayoritario de las paredes celulares de las bacterias (Ragland & Criss, 2017). Como consecuencia, esta enzima puede desencadenar la lisis bacteriana. Es probable que un fenómeno similar esté contribuyendo a que haya fluctuaciones en los recuentos de UFC/g antes y después de la

fase pupal (larvas tardías-Larvae\_L y adultos- Adult\_M y Adult\_F), y a que aparezcan diferencias en las medidas de diversidad en estos momentos del ciclo biológico.

La diversidad en adultos presenta un comportamiento diferencial al parecer asociado con el sexo. Las hembras permanecen con una diversidad baja comparadas con los machos en los que los índices de Shannon, Simpson y Chao1 se acercan a los observados en muestras de huevos (figura 5-6 D, E y F y tabla suplementaria C-2). Contrariamente, en *S. litoralis* las hembras poseen la comunidad bacteriana más diversa comparadas con los demás estadios (Chen et al., 2016)

Como se aprecia, la microbiota de *S. frugiperda* es dinámica durante su ciclo de vida, y su composición cambia significativamente como lo demuestra el análisis de PCoA, en el que se reveló la conformación de varios grupos que explican el 92% de la diversidad beta de las comunidades bacterianas asociadas al insecto (5-7 B). Estudios en lepidópteros han mostrado que las comunidades bacterianas intestinales pueden ser cambiantes a lo largo del ciclo de vida, es el caso de *S. litoralis*, *S. exigua* y *Heliconius erato* (Chen et al., 2016; Gao et al., 2019; Hammer, McMillan, & Fierer, 2014).

En el presente trabajo se observó que Firmicutes y Proteobacteria fueron los phyla dominantes a lo largo del desarrollo de *S. frugiperda* (figura 5-9 A), siendo consistente con lo documentado para otros lepidópteros (Chen et al., 2016; Gao et al., 2019; González-Serrano et al., 2020; Hammer et al., 2014; Wang et al., 2020). La abundancia de Firmicutes aumenta progresivamente hasta adquirir una predominancia casi absoluta en pupas (95%), mientras que Proteobacteria disminuye hasta valores de un 2% en este estadio. En la fase larvaria (larvas jóvenes y tardías), Firmicutes es el taxón más representativo; lo cual está de acuerdo con lo reportado por Gao et al., (2019) para *S. exigua* y por Chen et al., (2016) para *S. litoralis*.

A nivel de género encontramos una comunidad compleja en huevos, integrada principalmente por *Ileibacterium*, *Enterococcus*, *Dubosiella* y *Ralstonia*, los cuales permanecen en larvas jóvenes, aunque en abundancias diferentes. Llama la atención la aparición de *Carnobacterium* en larvas jóvenes (figura 6-1). Esta bacteria acidoláctica es conocida por tener efectos probióticos y producir bacteriocinas (González, Yien, Castrillón, & Ortega, 2013). Durante el desarrollo del insecto se observa una simplificación de las comunidades bacterianas, en donde *Enterococcus* sobresale como un género conservado

en todas las etapas y predominante en larvas jóvenes, larvas tardías, pupas y hembras (figura 6-1).

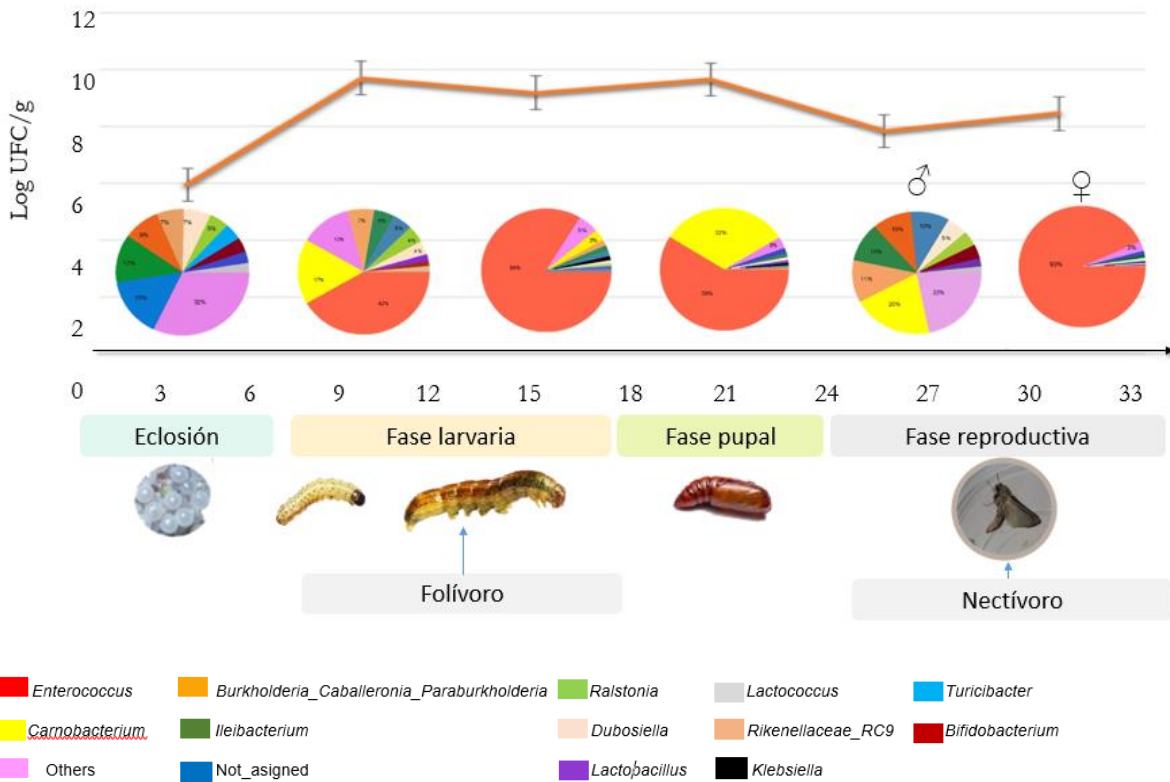
Durante la fase pupal, más del 90% de las secuencias corresponden a *Enterococcus* y *Carnobacterium*, en donde este último presenta un aumento significativo con respecto a las fases larvarias tardías. *Enterococcus* es un género común en lepidópteros y ha sido reportado como el taxón dominante en el intestino de larvas de *Galleria mellonella*, *S. littoralis* (Chen et al., 2016a), *S. exigua* (Gao et al., 2019), *Manduca sexta* (Brinkmann, Martens, & Tebbe, 2008), *Helicoverpa armígera* (Xiang et al., 2006), *Lymantria dispar* (Broderick, Raffa, Goodman, & Handelsman, 2004) y *S. frugiperda* (Higueta Palacio et al., 2021; Oliveira et al., 2021). Este género sigue presente en los adultos, con una abundancia relativa del 93% en hembras y 10% en machos. La persistencia y dominancia de este taxón durante todo el ciclo de vida de *S. frugiperda* permite presumir una relevancia funcional para el insecto.

Este es el primer reporte en donde se demuestra su presencia durante el ciclo de vida completo de *S. frugiperda*, lo que nos permite deducir que posee mecanismos adaptativos eficientes que le permiten permanecer durante la metamorfosis y posiblemente transmitirse verticalmente. En este trabajo, *Enterococcus* junto con *Ileibacterium* fueron identificados como el núcleo microbiano en las muestras de los dos biotipos de *S. frugiperda*. Se requieren futuras indagaciones para entender el papel de estos simbiontes en asociación con su insecto huésped.

Por último, cabe resaltar que la microbiota del macho presenta una clara similitud con la hallada en huevos y es radicalmente diferente a la de las hembras, lo que podría sugerir una transmisión vertical de la microbiota durante la cópula, como se mostró para *S. exigua* (Gao et al., 2019). Son necesarios nuevos experimentos en donde se examine la microbiota de un mayor número de machos para corroborar este hallazgo, ya que en este trabajo el número de muestras de machos adultos fue baja.



Figura 6-1. Dinámica de las comunidades bacterianas a nivel de género de *S. frugiperda* durante varias fases de su desarrollo.<sup>15</sup>



### 6.3 Comunidades bacterianas de *S. frugiperda* encontradas por el enfoque dependiente de cultivo y contraste con los hallazgos obtenidos por NGS

Como parte del estudio integral de la microbiota de *S. frugiperda*, se utilizó una estrategia dependiente de cultivo en la que se lograron aislar bacterias a partir de los mismos tejidos estudiados por NGS. Este enfoque resulta particularmente útil a la hora de realizar un

<sup>15</sup> Esta figura fue realizada con la herramienta "miro" disponible en:

<https://miro.com/app/board/uXjVO4A2lss=>

estudio más detallado de la taxonomía y actividades metabólicas de las bacterias, con miras a desarrollar estrategias eficientes en el control de la plaga.

De 87 aislados bacterianos obtenidos en cultivos puros, se seleccionaron 37 para la caracterización taxonómica mediante la secuenciación del ADNr 16S. Los resultados de estos análisis permitieron identificar que la comunidad cultivable estaba conformada principalmente por miembros de los phyla Firmicutes y Proteobacterias al igual que como ocurrió en los análisis de NGS. Se lograron aislar algunos miembros pertenecientes al phylum Actinobacteriota, que fue el cuarto de importancia en abundancia relativa en NGS (tabla 5-2, figura 5-3).

Similar a los resultados obtenidos con NGS, el género *Enterococcus* fue el taxón predominante, encontrándose en muestras de todas las fases de desarrollo y de los dos biotipos (tabla 5-2). El análisis de regiones parciales del ADNr 16S permitió establecer una filiación genética con secuencias en la base de datos del NCBI pertenecientes a tres especies de este género: *E. mundtii*, *E. casseliflavus* y *E. haemoperoxidus*. A tres de los aislados identificados como *E. mundtii* por el marcador molecular ADNr 16S se les realizó la confirmación de especie mediante la secuenciación del gen *gyrB* (figura 5-4).

*E. mundtii* es una bacteria anaerobia facultativa con la capacidad de formar biopelículas. Hace parte de las bacterias ácido lácticas y es descrita como una especie con propiedades probióticas. Produce la bacteriocina mundticina KS que inhibe el crecimiento de ciertos taxones bacterianos (Shao et al., 2017). Se encuentra como bacteria simbiótica en varias especies de lepidópteros. En *G. mellonella* se demostró que podía retenerse durante la metamorfosis, y parece que cumple un importante papel evitando el establecimiento de bacterias de los géneros *Serratia* y *Staphylococcus*. En la metamorfosis de *G. mellonella* se libera la enzima lisozima, que como se mencionó anteriormente; tiene actividad antibacteriana. Sin embargo, cuando se bloqueó la producción de lisozima vía ARNi (ARN de interferencia); las poblaciones de *Serratia* y *Staphylococcus* tuvieron un incremento significativo comparado con el insecto silvestre. Los autores sugieren que la lisozima suprime estas especies, pero no a *E. mundtii*. Otro hallazgo interesante es que las poblaciones de *Serratia sp.* y *Staphylococcus sp.*, se convierten en las más abundantes cuando *E. mundtii* no produce la bacteriocina, mostrando que la competencia microbiana

desempeña un papel preponderante en la estructuración de las comunidades bacterianas del intestino de *G. mellonella* (Johnston & Rolff, 2015).

En *S. littoralis* se reportó también que *E. mundtii* podía persistir durante su ciclo biológico (Chen et al. 2016), desempeñándose como una especie metabólicamente activa en el intestino de esta plaga (Shao, Arias-Cordero, & Boland, 2013). Si consideramos la estrecha relación existente entre estas especies de lepidópteros; es razonable pensar que *E. mundtii* puede presentar una relación simbiótica similar con *S. frugiperda*, lo cual puede sustentar su franco predominio y persistencia en diferentes fases de desarrollo de este insecto. Se hace necesario adelantar nuevos estudios que demuestren su papel en el ensamblaje de las comunidades microbianas intestinales en *S. frugiperda*.

Del phylum Proteobacteria se aislaron e identificaron dos representantes: *Leclercia adenocarboxylata* y *Enterobacter tabacci*. La secuenciación del gen *gyrB* permitió confirmar la identificación de la especie *L. adenocarboxylata*. Sin embargo, el aislado que había sido identificado como *E. tabaci* fue reclasificado como *E. huaxiensis* gracias a la secuenciación del gen *gyrB* (figura 5-4). El gen del ARNr 16S es un marcador muy útil en la clasificación taxonómica de bacterias, aunque presenta limitaciones en la resolución de algunas especies estrechamente relacionadas (Gunther, Almond, Yan, & Needleman, 2011) como es el caso de aquellas del género *Enterobacter*. El gen de la enzima girasa subunidad B presenta una tasa de evolución más elevada (Watanabe, Nelson, Harayama, & Kasai, 2001), pudiendo en la mayoría de los casos sortear estas discrepancias.

*L. adenocarboxylata* y *E. huaxiensis* pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, que son bacterias ubicuas en cuerpos de agua, suelo y el tracto digestivo de animales (Brenner, Krieg, Staley, & Garrity, 2005). *L. adenocarboxylata* se ha asociado con una alta actividad insecticida frente a *Leptinotarsa decemlineata* sugiriendo que puede ser usada en biocontrol de esta plaga (Muratoglu, Kati, Demirbag, & Sezen, 2009). En *S. frugiperda*, de Almeida, Moraes, Trigo, Omoto, & Consoli (2017) la aislaron del intestino de insectos resistentes a lambdacialotrina, deltametrina, espinosad, lufenuron y etil clorpirfos. Los autores encontraron que podía degradar este último insecticida en condiciones *in vitro*.

De acuerdo con Paniagua et al. (2018) quienes realizaron una revisión sobre los simbioses encontrados en lepidópteros *Bacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* y *Enterobacter* se encuentran entre los géneros más comunes encontrados en estos insectos, estando

presentes en más del 70% de las especies evaluadas. Estos géneros fueron encontrados en el presente trabajo tanto por técnicas dependientes de cultivo como por NGS.

*Carnobacterium* fue otro género recuperado en este trabajo. El aislado presenta una similitud del 96,6% con una secuencia del ADNr 16S de *C. maltaromaticum* depositada en el NCBI. Son bacterias probióticas de gran interés en la industria alimenticia. Algunas cepas de *C. maltaromaticum* pueden producir hasta tres bacteriocinas: carnocyclin A, piscicolin 126 y carnobacteriocin BM1, que pueden inhibir el crecimiento de bacterias como *E. faecalis*, *E. faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *C. divergens*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc gelidum*, *S. aureus* y *Clostridium botulinum*. Son bacterias psicrotolerantes que pueden resistir la congelación y descongelación, también soportan alta presión y son anaerobias facultativas (González et al., 2013). Fue encontrada en larvas, pupas y adultos del lepidóptero *Plutella xylostella*. Los análisis de diversidad funcional de secuencias intestinales de *P. xylostella* indicaron la presencia de las enzimas 4-beta-cellobiosidasa, endoglucanasa y beta-glucosidasa codificadas por *C. maltaromaticum* y *Enterobacter* sp., mostrando un papel en la degradación de carbohidratos complejos en el intestino de la plaga (Xia et al., 2017).. La cepa obtenida en este trabajo fue aislada de larvas jóvenes del biotipo arroz, pero el análisis de NGS mostró que presentó una abundancia relativa de 17% en larvas jóvenes (Larvae\_Y), 3% en larvas tardías (larvae\_L), 32% en pupas (Pupae) y 20% en machos adultos (Adult\_M). Se destaca el aumento significativo que se da de este taxón entre larvas tardías y pupas, por lo que vale la pena indagar su posible rol en la metamorfosis.

Otra bacteria ácido láctica identificada fue *Pediococcus pentosaceus*, esta bacteria al igual que *Carnobacterium* es un probiótico usado en suplementos para animales y humanos. Produce una bacteriocina llamada pediocina que se usa en procesos fermentativos para evitar contaminantes (García-Hernández, Pérez-Sánchez, García-Curbelo, Sosa-Cossio, & Nicoli, 2017). En la revisión de literatura solo se encontró un estudio en el insecto *Tenebrio molitor*, de cuyo intestino fue aislada esta bacteria. En ese reporte se prueba el efecto benéfico de este simbiote sobre el desarrollo del insecto y se demuestra su actividad antimicrobiana *in vitro* (Lecocq et al., 2021).

En este trabajo se pudieron aislar e identificar dos actinobacterias de los géneros *Cellulomonas* y *Curtobacterium*. Ambas están reportadas como bacterias promotoras del

crecimiento vegetal (Ahmed et al., 2014; Patel et al., 2022). No se encontraron ASVs pertenecientes a *Cellulomonas* en el análisis de NGS, y *Curtobacterium* estuvo presente en varias muestras, aunque en bajos niveles.

Finalmente, cabe señalar que los enfoques dependientes e independientes de cultivos presentaron resultados concordantes en términos generales. Se recuperaron miembros de los phyla más relevantes presentes en el insecto, aunque la mayoría de las bacterias identificadas por NGS no fueron aisladas en el medio de cultivo utilizado. Lo anterior se debe fundamentalmente a dos factores, el primero; que el medio de cultivo y las condiciones de crecimiento (como por ejemplo la disponibilidad de oxígeno, la presencia de CO<sub>2</sub>, la temperatura y la presencia de ciertos nutrientes); inducen a un sesgo en el aislamiento, pues crecen las bacterias más adaptadas a unas condiciones determinadas. El segundo factor, es que solo hasta un 5% de las bacterias presentes en un hábitat alcanzan a desarrollarse en los medios de cultivos convencionales (Tang et al., 2012). Es por ello necesario considerar los enfoques dependientes e independientes de cultivo como complementarios y su uso dependerá de los propósitos de cada estudio. En este trabajo el enfoque independiente de cultivo permitió obtener información más exhaustiva de la diversidad y composición de las comunidades bacterianas asociadas a los biotipos de *S. frugiperda* durante su ciclo biológico. El aislamiento de bacterias en medios de cultivo, contribuyó a tener datos más precisos en cuanto a la taxonomía de los miembros de la microbiota del insecto, y permitirá el desarrollo de nuevas investigaciones en cuanto a sus actividades metabólicas y su potencial uso en el biocontrol de esta plaga.

## 7. Conclusiones y recomendaciones

- La microbiota de *S. frugiperda* está conformada principalmente por bacterias de los géneros *Enterococcus*, *Ileibacterium*, *Dubosiella*, *Carnobacterium*, *Bukholderia* y *Ralstonia* pertenecientes a los phyla Firmicutes y Proteobacteria.
- Las comunidades bacterianas asociadas al intestino de *S. frugiperda* cambian significativamente durante el ciclo biológico de la plaga. Este es el primer reporte en el que se describe la microbiota intestinal durante el desarrollo completo del insecto. El estudio de los simbioses asociados a cada fase de desarrollo permite explorar nuevas alternativas de control dirigidas a cada estadio. El control de las diferentes formas de la plaga permitiría la minimización del impacto económico derivado de los daños causados por el gusano cogollero.
- No se encontraron diferencias significativas entre las comunidades microbianas de *S. frugiperda* del biotipo maíz frente a insectos del biotipo arroz de acuerdo con los análisis de beta- diversidad bajo las condiciones experimentales de este trabajo. Sin embargo, se logró determinar que *Klebsiella*, *Dermacoccus*, A2 (familia Lachnospiraceae), *Lachnoclostridium*, *Faecalibaculum* y *Leuconostoc* presentaban una abundancia diferencial significativa en el biotipo arroz, mientras que *Arsenophonus* y *Weissella* tuvieron una abundancia significativa en el biotipo maíz de acuerdo con el análisis de LEfSe. Es necesario indagar la relevancia de estos grupos microbianos en trabajos posteriores, en términos de poder establecer su posible rol funcional entre los biotipos.
- Mediante NGS se identificaron ASVs pertenecientes a los endosimbiontes *Arsenophonus* y *Spiroplasma*, los cuales presentaron correlación positiva con los biotipos maíz y arroz respectivamente de acuerdo con el análisis de correlación de patrones a nivel de género. Su presencia en muestras de huevos permite hipotetizar una posible transmisión vertical. Se requieren futuras evaluaciones para confirmar su presencia en tejido reproductivo mediante PCR con cebadores específicos que permitan su identificación inequívoca.

- La correlación negativa encontrada de *Arsenophonus* y el biotipo arroz y de *Spiroplasma* y el biotipo maíz, constituye una información relevante para futuros programas en los que se empleen estos endosimbiontes en el control biológico de *S. frugiperda*, pues podrían presentar efectividades distintas en cada biotipo. Se recomienda hacer ensayos de infección con cada endosimbionte para determinar su efecto en insectos de cada biotipo y validar estas observaciones.
- Se detectó un núcleo microbiano a nivel de género para las muestras de los dos biotipos y de todas las fases de desarrollo conformado por *Enterococcus* con una prevalencia mayor al 90 % e *Illeobacterium* con una prevalencia del 50%. De acuerdo con esto se deduce que *Enterococcus* fue el taxón más conservado en *S. frugiperda*.
- Se encontraron similitudes en la composición de las comunidades bacterianas de machos con las de huevos. Se sugiere una posible transmisión vertical de simbiontes durante la cópula. Se recomiendan nuevos ensayos en los que se amplíe el número de muestras de machos para confirmar este hallazgo, ya que en el presente trabajo su número fue bajo.
- Se lograron aislar bacterias con potenciales aplicaciones agroindustriales y de bioprospección de acuerdo con las capacidades metabólicas reportadas en la literatura. Se requieren investigaciones posteriores para demostrar su papel funcional en la interacción con el insecto hospedante a fin de desarrollar nuevas estrategias para el control de *S. frugiperda*.

La combinación de varias técnicas permitió una descripción amplia y profunda de las comunidades bacterianas estudiadas, y cada una de ellas proporcionó información relevante sobre la composición y estructura de las mismas.

## Anexos

### A. Anexo: Dieta para cría de larvas de Noctuidae de Shorey y Hale (1965) modificada para el estudio de microbioma de *S. frugiperda*

Ingrediente	Cantidad
Fríjol calima	114 g
Ácido ascórbico	3 g
Ácido sórbico	1 g
Benzoato de sodio	0,25 g
Germen de trigo	54 g
Agar bacteriológico	20 g
Agua destilada	350 mL

#### Procedimiento

- Pesar los ingredientes y triturar en un procesador de alimentos hasta obtener una papilla
- Esterilizar en autoclave a 120°C, 15 libras de presión durante 20 minutos.
- Servir en contenedores individuales por cada larva.
- Reemplazar diariamente.

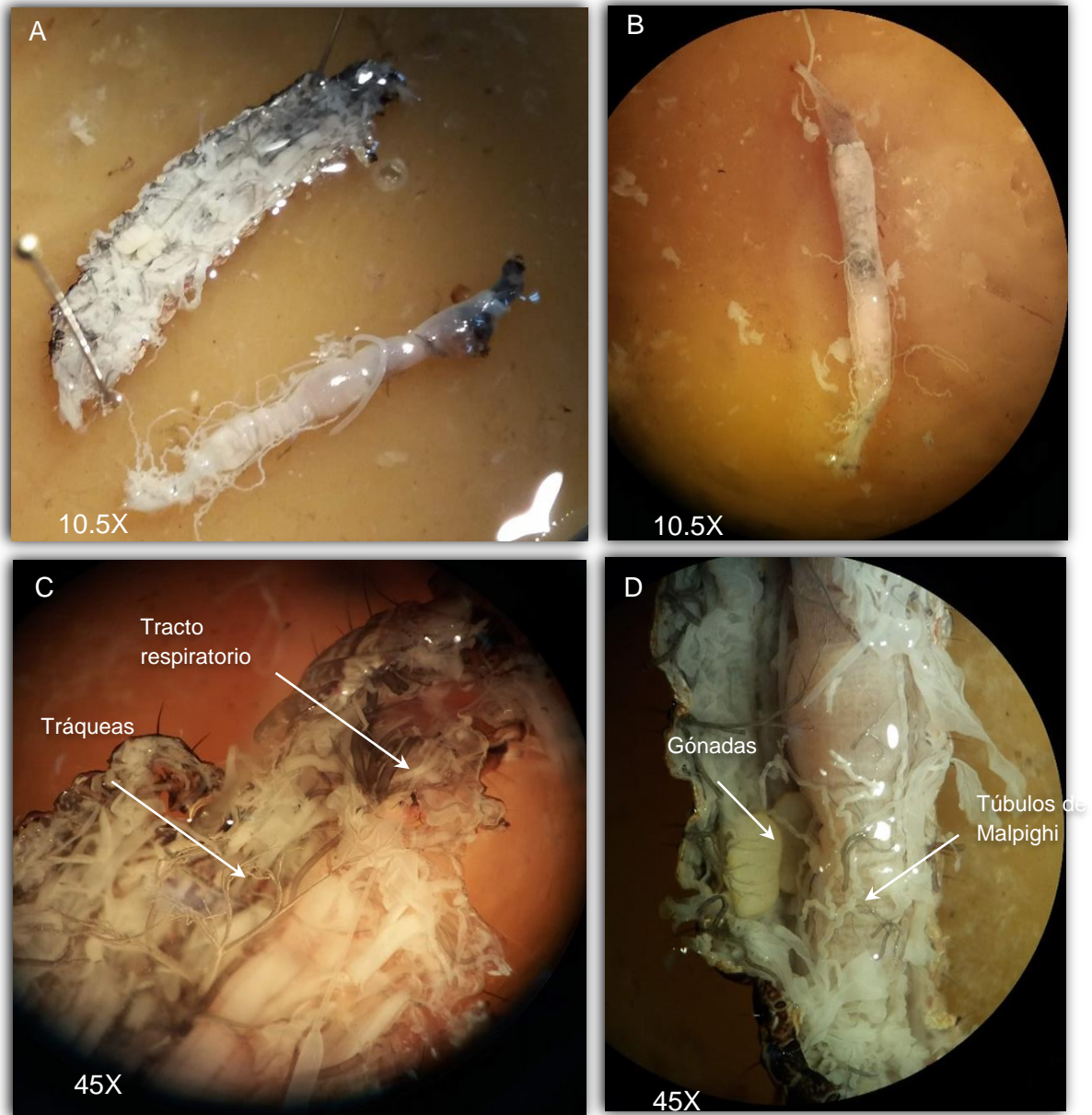


## **B. Anexo: Estudio de la anatomía del tracto digestivo en larvas y adultos de *S. frugiperda***

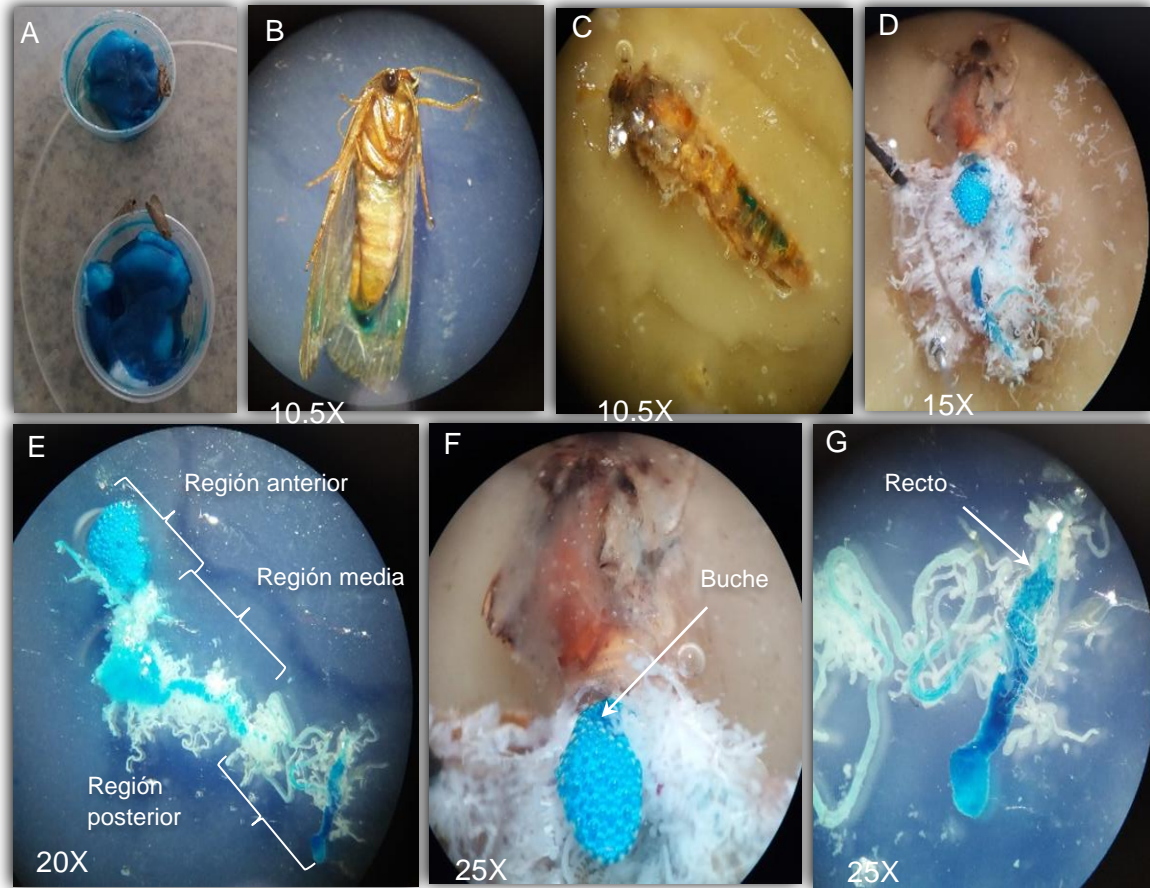
Con el objetivo de estandarizar el protocolo de disección de tejidos gastrointestinales de larvas de distintos estadios y de adultos de *S. frugiperda*, se realizaron varias pruebas encaminadas a obtener de manera sencilla los tejidos de interés. El proceso de disección de intestinos en larvas jóvenes y adultos es especialmente dispendioso debido al reducido tamaño de la larva y a la complejidad anatómica del insecto adulto. Por tal razón, previa a la obtención de los tejidos que iban a ser usados en los ensayos del proyecto, se llevó a cabo un entrenamiento en el que se realizó un reconocimiento de las estructuras anatómicas en larvas jóvenes y tardías de *S. frugiperda*. Los insectos usados se fijaron en cera para su estudio detallado usando un microscopio estereoscopio. En la figura S B-1 se muestran detalles de las estructuras respiratorias, digestivas y excretoras del insecto.

Para el estudio de los insectos adultos, se separaron 10 adultos, 5 machos y 5 hembras en jaulas plásticas. Para ayudar a visualizar la ubicación y el reconocimiento del tracto gastrointestinal completo de adultos machos y hembras de *S. frugiperda*, se incorporó el colorante hidrosoluble de grado alimentario Azul No. 1, el cual se utilizó a razón de una gota por cada 100 mL de la solución de agua miel empleada para alimentar las polillas. Los insectos se dejaron alimentar a libre demanda durante 3 días. Se siguió el protocolo para el sacrificio, lavado y desinfección descrito en la metodología (sección 4.2: obtención de tejidos) y se realizó el estudio del sistema digestivo del insecto adulto guiado por el recorrido que señalaba el colorante. El colorante facilitó la identificación del recorrido del tracto gastrointestinal en su totalidad y de las regiones y estructuras asociadas, lo cual permitió el entrenamiento necesario para posteriormente incluir un lote de insectos alimentados con agua-miel sin colorante para el análisis de su microbiota intestinal.

**Figura suplementaria B-1.** Estudio de estructuras anatómicas en larvas de *S. frugiperda*. A y B. Disección de sistema digestivo. C. Vista del sistema respiratorio del insecto D. Se observan ramas de los túbulos de Malpighi y al lado izquierdo las gónadas.

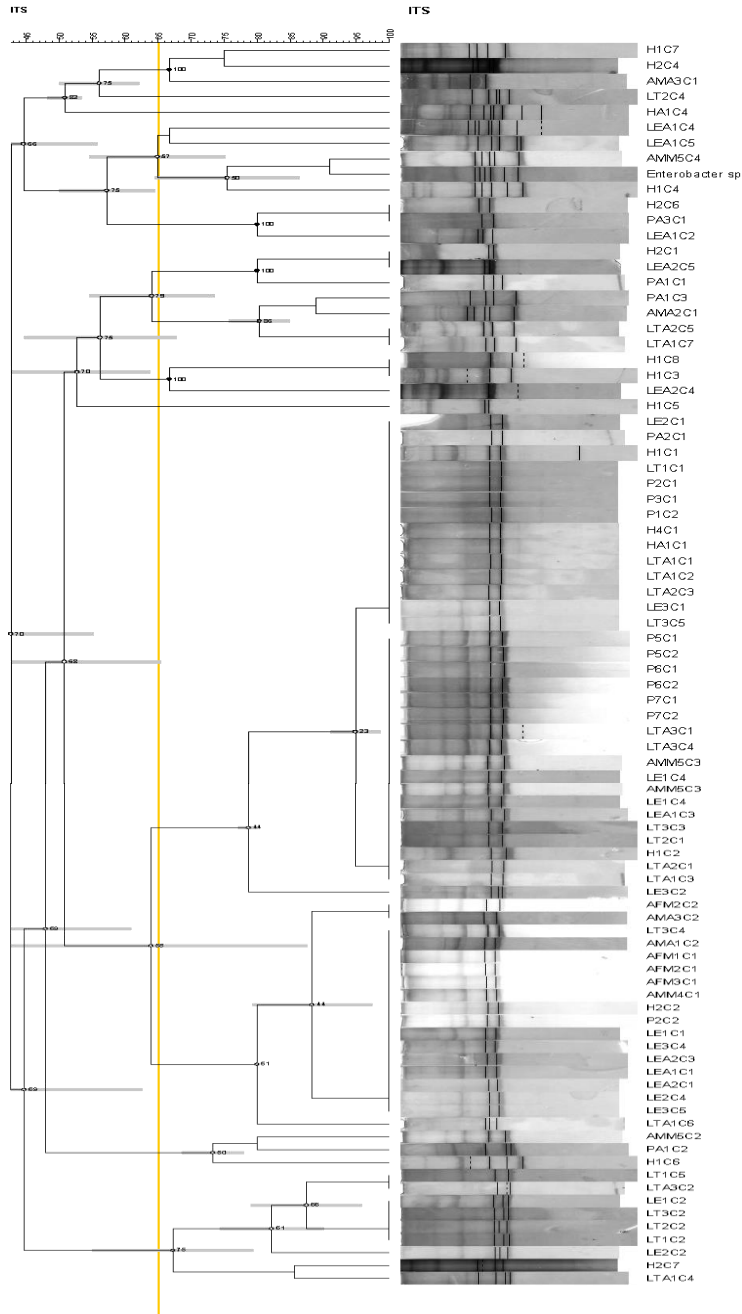


**Figura suplementaria B-2.** Estudio del tracto gastrointestinal en adultos de *S. frugiperda*. A. Sistema usado para la alimentación de las polillas. Aspecto de los adultos alimentados con agua-miel teñida con Azul No.1, B: Vista ventral y C: vista dorsal externa del insecto. D: Abdomen con el sistema digestivo expuesto marcado con colorante. E, F y G: Detalles de regiones y estructuras digestivas.



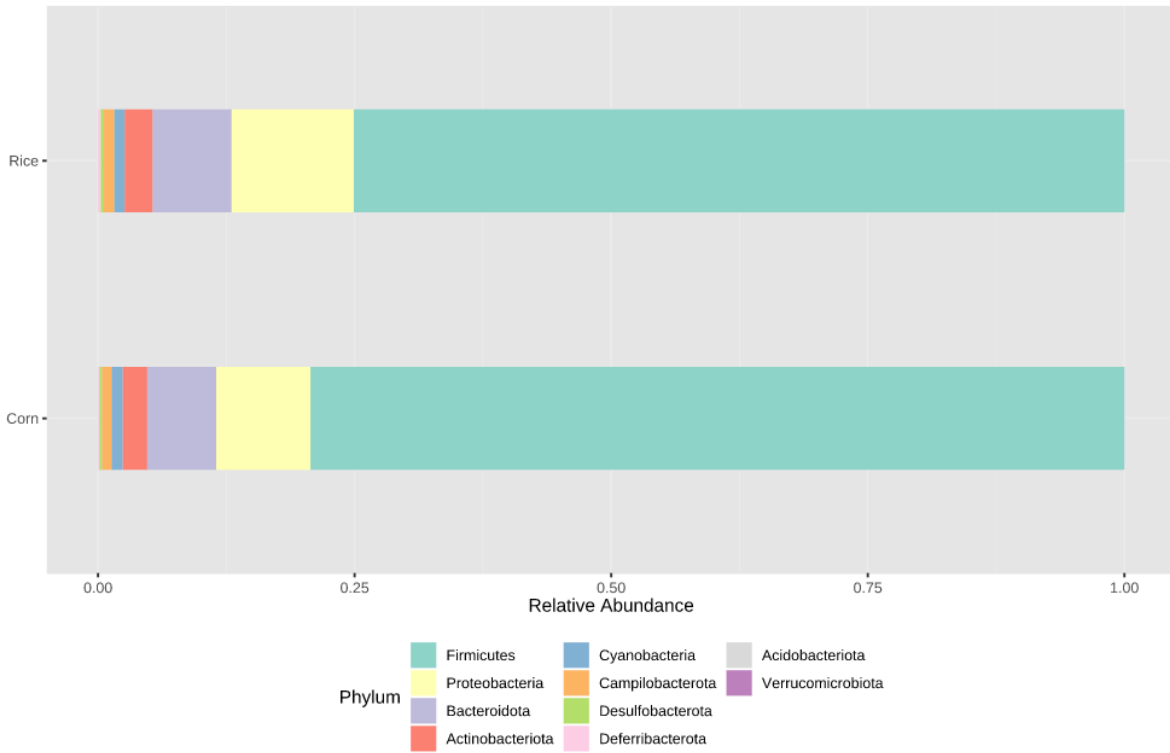
## C. Anexo: Resultados

Figura suplementaria C-1. Análisis de conglomerados de la región ITS de los aislados bacterianos<sup>16</sup>

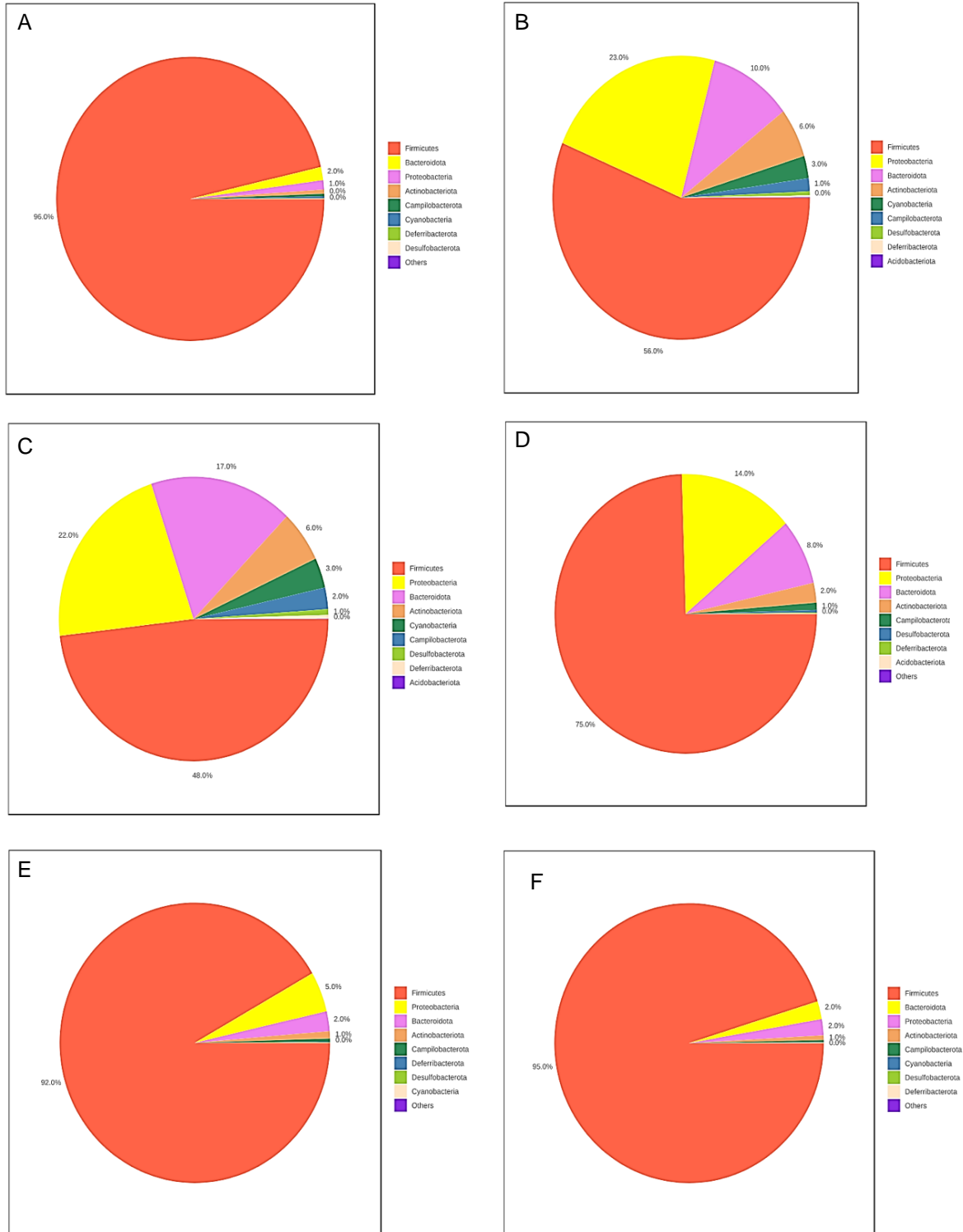


<sup>16</sup> Dendrograma obtenido mediante el software GelCompar II. Se realizó un análisis de agrupamiento usando el coeficiente Dice y el Promedio Aritmético no Ponderado (UPGMA) de la región ITS de las bacterias aisladas de muestras de tejidos de *S. frugiperda*.

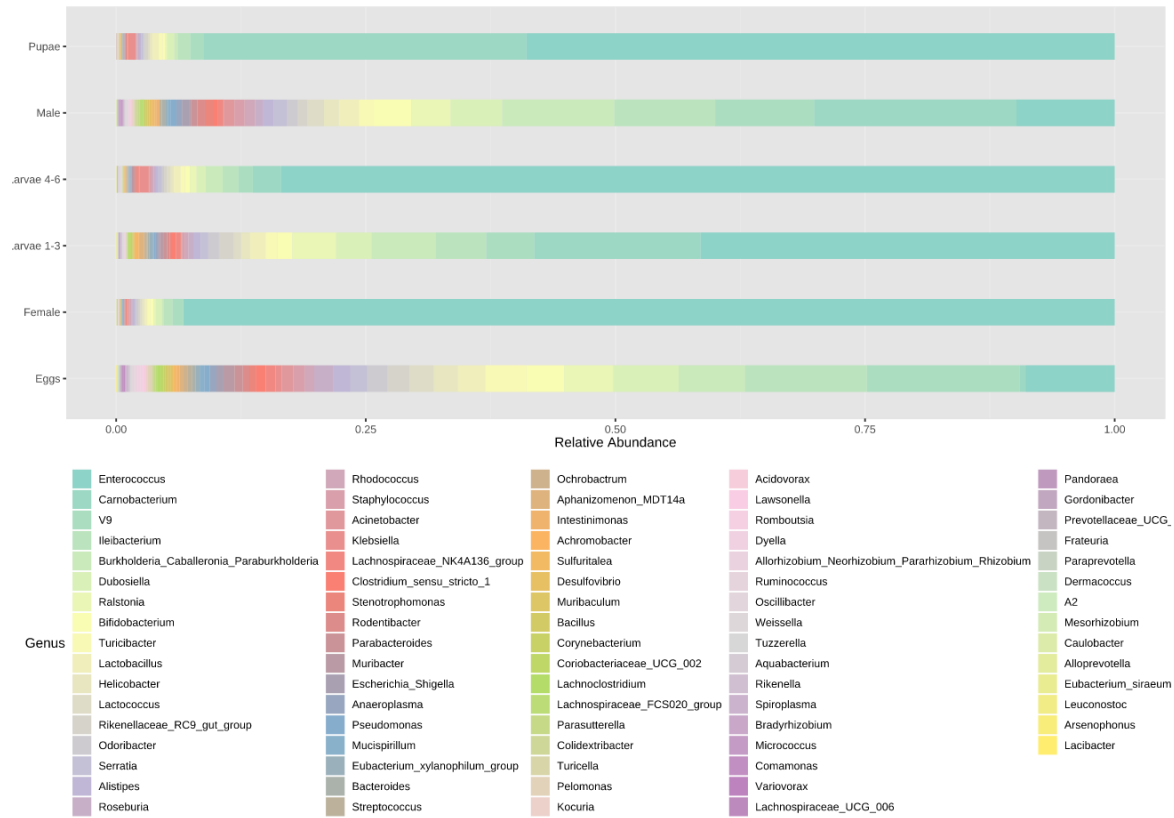
**Figura suplementaria C-2.** Perfil de abundancia relativa de ASVs en muestras de *S. frugiperda* a nivel de phylum de acuerdo con el biotipo



**Figura suplementaria C-3.** Abundancia relativa de ASVs en muestras de *S. frugiperda* a nivel de phylum por fase de desarrollo A: Hembras adultas, B: Machos adultos, C: Huevos, D: Larvas jóvenes, E: Larvas tardías y F: pupas



**Figura suplementaria C-4.** Abundancia relativa a nivel de género en muestras de *S. frugiperda* de acuerdo a la fase de desarrollo.



**Tabla suplementaria C-1.** Consolidado de datos de calidad de secuenciación NGS por Illumina MySeq

	<b>Input</b>	<b>Filtered</b>	<b>DenoisedF</b>	<b>DenoisedR</b>	<b>Merged</b>	<b>Nonchim</b>
<b>Adult_F_C1</b>	431064	316990	314967	315046	300308	289311
<b>Adult_F_C2</b>	473685	358479	355243	356698	339650	329316
<b>Adult_F_C3</b>	282111	200323	198550	199380	189720	180769
<b>Adult_M_C3</b>	205538	150705	148349	148912	140809	126765
<b>Adult_M_C5</b>	525868	359015	356802	356290	336963	67399
<b>Eggs_C1</b>	364105	256060	254464	253671	238447	220505
<b>Eggs_C2</b>	171829	124632	122614	122292	110946	100611
<b>Eggs_C3</b>	129742	91850	90326	90095	82571	75332
<b>Eggs_C4</b>	166248	116208	114882	114799	91235	84822
<b>Eggs_R1</b>	129540	102876	102019	101496	92204	85237
<b>Eggs_R2</b>	352095	213712	212137	211091	188340	175724
<b>Eggs_R3</b>	134021	93237	91863	91507	85135	78480
<b>Larvae_Y_C2</b>	314767	196183	194627	194675	184363	155162
<b>Larvae_Y_R1</b>	255453	169753	168346	168219	158125	129625
<b>Laevae_Y_R 2</b>	471525	305108	303153	302465	283812	257944
<b>Larvae_L_C1</b>	290845	194973	193690	193610	184681	160819
<b>Larvae_L_C2</b>	243939	187014	186187	186199	180481	170688
<b>Larvae_L_C3</b>	226755	170694	170229	170115	166682	156766
<b>Larvae_L_R1</b>	186194	149995	149519	149520	146093	142203
<b>Larvae_L_R2</b>	475376	357699	356934	356171	346996	318680
<b>Larvae_L_R3</b>	186291	115838	114497	114447	107508	98249
<b>Pupae_C2</b>	244509	186492	185620	185921	180087	176232
<b>Puepae_C3</b>	215654	149494	148340	148342	140752	126444
<b>Pupae_C5</b>	129224	103432	103100	103029	101327	99735
<b>Pupae_C6</b>	165973	128113	127601	127325	124601	121928
<b>Pupae_C7</b>	143094	113605	113244	113283	111378	102437
<b>Pupae_R1</b>	389104	288784	288039	287835	279472	262041
<b>Pupae_R2</b>	369546	265321	264289	264032	252947	232934



**Tabla suplementaria C-2.** Índices de alfa diversidad y Good's coverage de secuencias de ADNr 16S obtenidas por Illumina MySeq de diferentes fases de desarrollo y biotipos de *S. frugiperda* en Colombia<sup>17</sup>

Sample	Chao 1	Shannon	Simpson	Observed_spe cies	Good's_cove rage
Eggs_C	73,00	3,46	0,95	73,00	100,00
Eggs_C.1	74,00	3,29	0,94	74,00	100,00
Eggs_C.2	72,00	3,21	0,93	71,00	100,00
Eggs_C.3	65,00	3,35	0,95	65,00	100,00
Eggs_R	65,00	2,15	0,68	65,00	100,00
Eggs_R.1	73,00	3,43	0,95	73,00	100,00
Eggs_R.2	74,00	3,33	0,94	74,00	100,00
Larvae_Y_C	74,00	1,87	0,70	74,00	100,00
Larvae_Y_R	62,00	1,91	0,70	62,00	100,00
Larvae_Y_R. 1	66,00	2,95	0,90	66,00	100,00
Larvae_L_C	63,00	1,48	0,51	63,00	100,00
Larvae_L_C. 1	51,00	0,34	0,10	50,00	99,99
Larvae_L_C. 2	45,00	0,32	0,11	42,00	99,98
Larvae_L_R	51,17	0,43	0,13	51,00	99,99
Larvae_L_R. 1	56,50	0,50	0,17	56,00	99,98
Larvae_L_R. 2	63,00	2,06	0,65	63,00	100,00
Pupae_C	62,00	0,42	0,12	60,00	99,98
Pupae_C.1	60,00	2,03	0,75	60,00	100,00
Pupae_C.2	20,00	0,09	0,02	20,00	100,00
Pupae_C.3	31,33	0,17	0,05	31,00	100,00
Pupae_C.4	27,50	0,09	0,02	26,00	99,99
Pupae_R	63,60	0,76	0,27	63,00	99,99
Pupae_R.1	60,25	0,76	0,25	60,00	99,99
Adult_F_C	57,00	0,51	0,14	57,00	100,00
Adult_F_C.1	59,30	0,24	0,06	59,00	99,98
Adult_F_C.2	54,50	0,63	0,18	54,00	100,00
Adult_M_C	64,00	2,32	0,79	64,00	100,00
Adult_M_C.1	63,00	3,16	0,92	63,00	100,00

<sup>17</sup> Eggs: huevos, Larvae\_Y: larva joven, Larvae\_L: larva tardía, Pupae: pupa, Adult\_F: hembra adulta, Adult\_M: macho adulto. El biotipo se indica con la letra C (maíz) o R (arroz) después de la denominación de la fase de desarrollo, ejemplo; Larva\_L\_R: larva tardía biotipo arroz.

**Tabla suplementaria C-3.** Recuento de log UFC/g de bacterias de diferentes tejidos de *S. frugiperda*. Estadísticos descriptivos<sup>18</sup>

Variable	Observaciones	Obs. con datos perdidos	Obs. sin datos perdidos	Mínimo	Máximo	Mediana	Desv. típica
Eggs_C	6	0	6	5,720	5,975	5,870	0,094
Larvae_Y_C	6	0	6	8,983	9,624	9,380	0,256
Larvae_L_C	6	0	6	7,335	8,302	7,788	0,448
Pupae_C	6	0	6	8,045	8,242	8,162	0,067
Adult_M_C	6	0	6	7,443	7,587	7,553	0,055
Adult_F_C	6	0	6	7,873	7,974	7,925	0,039
Eggs_R	6	0	6	5,953	6,406	6,161	0,218
Larvae_Y_R	6	0	6	9,593	9,714	9,652	0,048
Larvae_L_R	6	0	6	9,105	9,392	9,251	0,121
Pupae_R	6	0	6	9,728	9,900	9,814	0,084
Adult_M_R	6	0	6	7,547	7,981	7,762	0,163
Adult_F_R	6	0	6	8,374	8,462	8,403	0,032

<sup>18</sup> Eggs: huevos, Larvae\_Y: larva joven, Larvae\_L: larva tardía, Pupae: pupa, Adult\_F: hembra adulta, Adult\_M: macho adulto. El biotipo se indica con la letra C (maíz) o R (arroz) después de la denominación de la fase de desarrollo, ejemplo; Larva\_L\_R: larva tardía biotipo arroz.

**Tabla suplementaria C-4.** Comparaciones múltiples por pares mediante el procedimiento de Dunn /Prueba bilateral, entre los recuentos de log UFC/g de bacterias de tejidos de *S. frugiperda*.

<b>Muestra</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Suma de rangos</b>	<b>Media de rangos</b>	<b>Grupos</b>
Eggs_C	6	24,000	4,000	A
Eggs_R	6	54,000	9,000	A B
Adult_M_C	6	116,000	19,333	A B C
Adult_M_R	6	148,000	24,667	A B C D
Larvae_L_C	6	155,000	25,833	A B C D
Adult_F_C	6	177,000	29,500	A B C D E
Pupae_C	6	229,000	38,167	A B C D E
Adult_F_R	6	273,000	45,500	B C D E
Larvae_L_R	6	321,000	53,500	C D E
Larvae_Y_C	6	336,000	56,000	C D E
Larvae_Y_R	6	378,000	63,000	D E
Pupae_R	6	417,000	69,500	E

**Tabla suplementaria C-5.** Comparaciones múltiples por pares mediante el procedimiento de Dunn / Prueba bilateral, entre los recuentos de log UFC/g de bacterias de tejidos de *S. frugiperda*: valores-p.

	Eggs_ _C	Larvae _Y_C	Larvae _L_C	Pupa e_C	Adult_ M_C	Adult_ _F_C	Eggs_ _R	Larvae _Y_R	Larvae _L_R	Pupa e_R	Adult_ M_R	Adult_ _F_R
Eggs_ C	1	<0,00 01	0,071	0,00 5	0,204	0,035	0,67 9	<0,00 01	<0,00 01	<0,0 001	0,087	0,001
Larvae _Y_C	<0,0 001	1	0,013	0,14 0	0,002	0,028	0,00 0	0,562	0,836	0,26 4	0,010	0,385
Larvae _L_C	0,07 1	0,013	1	0,30 7	0,591	0,762	0,16 4	0,002	0,022	0,00 0	0,923	0,104
Pupae _C	0,00 5	0,140	0,307	1	0,119	0,473	0,01 6	0,040	0,204	0,01 0	0,264	0,544
Adult_ M_C	0,20 4	0,002	0,591	0,11 9	1	0,400	0,39 2	0,000	0,005	<0,0 001	0,659	0,030
Adult_ _F_C	0,03 5	0,028	0,762	0,47 3	0,400	1	0,09 0	0,006	0,047	0,00 1	0,689	0,185
Eggs_ R	0,67 9	0,000	0,164	0,01 6	0,392	0,090	1	<0,00 01	0,000	<0,0 001	0,195	0,003
Larvae _Y_R	<0,0 001	0,562	0,002	0,04 0	0,000	0,006	<0,0 001	1	0,432	0,59 1	0,002	0,148
Larvae _L_R	<0,0 001	0,836	0,022	0,20 4	0,005	0,047	0,00 0	0,432	1	0,18 5	0,017	0,508
Pupae _R	<0,0 001	0,264	0,000	0,01 0	<0,00 01	0,001	<0,0 001	0,591	0,185	1	0,000	0,047
Adult_ M_R	0,08 7	0,010	0,923	0,26 4	0,659	0,689	0,19 5	0,002	0,017	0,00 0	1	0,085
Adult_ _F_R	0,00 1	0,385	0,104	0,54 4	0,030	0,185	0,00 3	0,148	0,508	0,04 7	0,085	1

Nivel de significación corregido de Bonferroni: 0,0008

## 8. Bibliografía

- Abrahams, P., Bateman, M., Beale, T., Clotey, V., Cock, M., Colmenarez, Y., Godwin, J. (2017). Fall armyworm: impacts and implications for Africa. Evidence note (2). *Center for Agriculture and Bioscience International-CABI*.
- Adamczyk, J., Holloway, J., Leonard, B., & Graves, J. (1997). Susceptibility of fall armyworm collected from different plant hosts to selected insecticides and transgenic Bt cotton. *Journal of Cotton Science*.
- Ahmed, I., Kudo, T., Abbas, S., Ehsan, M., Iino, T., Fujiwara, T., & Ohkuma, M. (2014). *Cellulomonas pakistanensis* sp. nov., a moderately halotolerant Actinobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt\_7), 2305–2311.
- Almeida, L. G. de, Moraes, L. A. B. de, Trigo, J. R., Omoto, C., & Consoli, F. L. (2017). The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: A potential source for biotechnological exploitation. *PloS One*, 12(3), e0174754.
- Atnafu, W., Beyene, P., Zemedu, A., & Yitbarek, W. (2021). Prevalence and impacts of fall army worms (*Spodoptera frugiperda*) on maize (*Zea mays*) production and productivity in Ethiopia. *ISABB Journal of Food and Agricultural Sciences*, 10(2), 21–27.
- Ayala, O., Navarro, F., & Virla, E. G. (2013). Evaluation of the attack rates and level of damages by the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), affecting corn-crops in the northeast of Argentina. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias*, 45(2).
- Belda, E., Pedrola, L., Peretó, J., Martínez-Blanch, J. F., Montagud, A., Navarro, E., ... Porcar, M. (2011). Microbial diversity in the midguts of field and lab-reared populations of the European corn borer *Ostrinia nubilalis*. *PLoS One*, 6(6), e21751.
- Benjamino, J., & Graf, J. (2016). Characterization of the core and caste-specific microbiota in the termite, *Reticulitermes flavipes*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 171.
- Boregas, K., Mendes, S., Waquil, J., & Fernandes, G. (2013). Estádio de adaptação de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. *Bragantia*, 72(1), 61–70.
- Botha, A. S., Erasmus, A., du Plessis, H., & Van den Berg, J. (2019). Efficacy of Bt maize for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in South Africa. *Journal of Economic Entomology*, 112(3), 1260–1266.

- Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., & Garrity, G. M. (2005). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two the Proteobacteria Part C the Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. Springer.
- Brinkmann, N., Martens, R., & Tebbe, C. (2008). Origin and diversity of metabolically active gut bacteria from laboratory-bred larvae of *Manduca sexta* (Sphingidae, Lepidoptera, Insecta). *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(23), 7189–7196.
- Broderick, N. A., Raffa, K. F., Goodman, R. M., & Handelsman, J. (2004). Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, *70*(1), 293–300.
- Buntin, G. D. (1986). A review of plant response to fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith), injury in selected field and forage crops. *Florida Entomologist*, 549–559.
- Burtet, L. M., Bernardi, O., Melo, A. A., Pes, M. P., Strahl, T. T., & Guedes, J. V. C. (2017). Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in southern Brazil. *Pest Management Science*, *73*(12), 2569–2577.
- Cañas-Hoyos, N., Lobo-Echeverri, T., & Saldamando-Benjumea, C. I. (2017). Chemical Composition of Female Sexual Glands of *Spodoptera frugiperda* 1 Corn and Rice Strains from Tolima, Colombia. *Southwestern Entomologist*, *42*(2), 375–395.
- Cañas-Hoyos, N., Márquez, E. J., & Saldamando-Benjumea, C. I. (2014). Differentiation of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) corn and rice strains from central Colombia: a wing morphometric approach. *Annals of the Entomological Society of America*, *107*(3), 575–581.
- Cano-Calle, D., Arango-Isaza, R. E., & Saldamando-Benjumea, C. I. (2015). Molecular identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) corn and rice strains in Colombia by using a PCR-RFLP of the mitochondrial gene cytochrome oxidase I (COI) and a PCR of the gene FR (for rice). *Annals of the Entomological Society of America*, *108*(2), 172–180.
- Cano-Calle, Daniela. (2020). *Caracterización Molecular de trips (Thysanoptera: Thripidae) procedentes de cultivos comerciales de aguacate (Persea americana Mill) del oriente antioqueño y estudio de la diversidad microbiana asociada*. Universidad Nacional de Colombia.
- Capinera, J. L. (2002). Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Insecta: Lepidoptera: Noctuidae): EENY098/IN255, rev. 7/2000. *EDIS*, 2002(7).
- Carrière, Y., Ellers-Kirk, C., Biggs, R., Higginson, D., Dennehy, T., & Tabashnik, B. (2004).

- Effects of gossypol on fitness costs associated with resistance to Bt cotton in pink bollworm. *Journal of Economic Entomology*, 97(5), 1710–1718.
- Casmuz, A., Juárez, M. L., Socías, M. G., Murúa, M. G., Prieto, S., Medina, S., ... Gastaminza, G. (2010). Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 69(3–4), 209–231. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=322028487010>
- Castañeda, Y., Cadavid, G., Saldamando-Benjumea, C., & Moreno, C. (2022). *Evaluación de la microbiota del tracto gastrointestinal del biotipo de maíz de Spodoptera frugiperda en presencia de endotoxinas del Bacillus thuringiensis*. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.
- Chapman, J. W., Williams, T., Escribano, A., Caballero, P., Cave, R. D., & Goulson, D. (1999). Fitness consequences of cannibalism in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Behavioral Ecology*, 10(3), 298–303.
- Chapman, R. F., & Chapman, R. F. (1998). *The insects: structure and function*. Cambridge university press.
- Chen, B., Teh, B.-S., Sun, C., Hu, S., Lu, X., Boland, W., & Shao, Y. (2016a). Biodiversity and activity of the gut microbiota across the life history of the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *Scientific Reports*, 6, 29505.
- Chen, B., Teh, B.-S., Sun, C., Hu, S., Lu, X., Boland, W., & Shao, Y. (2016b). Biodiversity and activity of the gut microbiota across the life history of the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *Scientific Reports*, 6(1), 1–14.
- Chhetri, L. B., & Acharya, B. (2019). Fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*): A threat to food security for south Asian country: Control and management options: A review. *Farm. Manag*, 4, 38–44.
- Day, R., Abrahams, P., Bateman, M., Beale, T., Clotey, V., Cock, M., ... Witt, A. (2017). Fall armyworm: impacts and implications for Africa. *Evidence Note* (2).
- del Valle, F., Carrizo, A., Romero, C., Baigorí, M., & Pera, L. (2019). *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) strains from northern Argentina: esterases, profiles, and susceptibility to *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae). *Florida Entomologist*, 102(2), 347–352.
- Douglas, A. E. (1998). Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology*, 43(1), 17–37.
- Dowell, R. V, Basham, H. G., & McCoy, R. E. (1981). Influence of five *Spiroplasma* strains

- on growth rate and survival of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 37(3), 231–235.
- Drès, M., & Mallet, J. (2002). Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 357(1420), 471–492.
- Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 214.
- Dumas, P., Barbut, J., Le Ru, B., Silvain, J.-F., Clamens, A.-L., d'Alençon, E., & Kergoat, G. J. (2015). Phylogenetic molecular species delimitations unravel potential new species in the pest genus *Spodoptera* Guenée, 1852 (Lepidoptera, Noctuidae). *PLoS One*, 10(4), e0122407.
- Dumas, P., Legeai, F., Lemaitre, C., Scaon, E., Orsucci, M., Labadie, K., ... Vavre, F. (2015). *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) host-plant variants: two host strains or two distinct species? *Genetica*, 143(3), 305–316.
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699–735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- Engelstädter, J., & Hurst, G. D. D. (2009). The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, 127–149.
- Eski, A., Demir, İ., Güllü, M., & Demirbağ, Z. (2018). Biodiversity and pathogenicity of bacteria associated with the gut microbiota of beet armyworm, *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Microbial Pathogenesis*, 121, 350–358.
- Espejo, R., Feijóo, C. G., Romerol, J., & Vásquez, M. (1998). *PACE analysis of the heteroduplexes formed between PCR-amplified 16S rRNA genes: Estimation of sequence similarity and rDNA complexity.*
- FAO. (2018). *Integrated management of the Fall Armyworm on maize. A guide for Farmer Field Schools in Africa.* Retrieved from <http://www.fao.org/3/i8665en/i8665en.pdf>
- FAO. (2020). *FAO Fall Armyworm: Map of the Worldwide Spread of Fall Armyworm Since 2016 (as of March 2020), Compiled Using Information from a Range of Sources, Including FAO, International Plant Protection Convention, CABI, the European and Mediterranean Plant Protect.* Retrieved February 10, 2020, from <http://www.fao.org/fall-armyworm/monitoring-tools/faw-map/en/>
- FAO, & CABI. (2019). *Community-based fall armyworm (Spodoptera frugiperda)*



- monitoring, early warning and management. In *Community-based fall armyworm (Spodoptera frugiperda) monitoring, early warning and management*. (First edit). Retrieved from <http://www.fao.org/3/CA2924EN/ca2924en.pdf>
- Farias, J. R., Andow, D. A., Horikoshi, R. J., Sorgatto, R. J., Fresia, P., dos Santos, A. C., & Omoto, C. (2014). Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Protection*, *64*, 150–158.
- Ferreira Filho, J. B. S., Alves, L. R. A., Gottardo, L. C. B., & Georgino, M. (2010). Dimensionamento do custo econômico representado por *Spodoptera frugiperda* na cultura do milho no Brasil. *48 Congresso Sociedade Brasileira de Economia, Administracao e Sociologia Rural*.
- Frago, E., Dicke, M., & Godfray, H. C. J. (2012). Insect symbionts as hidden players in insect–plant interactions. *Trends in Ecology & Evolution*, *27*(12), 705–711.
- Gao, X., Li, W., Luo, J., Zhang, L., Ji, J., Zhu, X., ... Cui, J. (2019). Biodiversity of the microbiota in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Applied Microbiology*, *126*(4), 1199–1208.
- García-Hernández, Y., Pérez-Sánchez, T., García-Curbelo, Y., Sosa-Cossio, D., & Nicoli, J. R. (2017). Capacidad de crecimiento, actividad antimicrobiana y susceptibilidad a antimicrobianos de dos cepas de *Pediococcus pentosaceus*, candidatas a probiótico. *Cuban Journal of Agricultural Science*, *51*(4), 433–442.
- García, F., Mosquera, M. T., Vargas, C. A., & Rojas, L. (2002). *Control biológico, microbiológico y físico de Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae), plaga del maíz y otros cultivos en Colombia*. Sociedad Colombiana de Entomología, Bogota (Colombia).
- Garlet, C., Moreira, R., Gubiani, P., Palharini, R., Farias, J., & Bernardi, O. (2021). Fitness cost of chlorpyrifos resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on different host plants. *Environmental Entomology*, *50*(4), 898–908.
- Gayatri Priya, N., Ojha, A., Kajla, M. K., Raj, A., & Rajagopal, R. (2012). Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera*. *PloS One*, *7*(1), e30768.
- Gichuhi, J., Subramanian, S., Khamis, F. M., van den Berg, J., du Plessis, H., Ekesi, S., & Herren, J. K. (2019). Diversity of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* and their gut bacterial community in Kenya. *BioRxiv*, 664987. <https://doi.org/10.1101/664987>
- Goergen, G., Kumar, P. L., Sankung, S. B., Togola, A., & Tamò, M. (2016). First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera,

- Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. *PloS One*, 11(10), e0165632.
- Gómez, J., Guevara, J., Cuartas, P., Espinel, C., & Villamizar, L. (2013). Microencapsulated *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: insecticidal activity and effect on arthropod populations in maize. *Biocontrol Science and Technology*, 23(7), 829–846.
- González-Maldonado, M. B., Gurrola-reyes, J. N., & Chaírez-Hernández, I. (2015). Productos biológicos para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 41(119), 200–204. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v41n2/v41n2a09.pdf>
- González-Serrano, F., Pérez-Cobas, A., Rosas, T., Baixeras, J., Latorre, A., & Moya, A. (2020). The gut microbiota composition of the moth *Brithys crini* reflects insect metamorphosis. *Microbial Ecology*, 79(4), 960–970.
- González, M. I., Yien, W., Castrillón, J. A., & Ortega, Á. (2013). Adición de *Carnobacterium maltaromaticum* CB1 en chorizo y morcilla empacados al vacío, para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. *Vitae*, 20(1), 23–29.
- Gouin, A., Bretaudeau, A., Nam, K., Gimenez, S., Aury, J.-M., Duvic, B., ... Darboux, I. (2017). Two genomes of highly polyphagous lepidopteran pests (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae) with different host-plant ranges. *Scientific Reports*, 7(1), 11816.
- Groot, A., Marr, M., Schöfl, G., Lorenz, S., Svatos, A., & Heckel, D. (2008). Host strain specific sex pheromone variation in *Spodoptera frugiperda*. *Frontiers in Zoology*, 5(1), 20. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-5-20>
- Gunther IV, N. W., Almond, J., Yan, X., & Needleman, D. S. (2011). GyrB versus 16S rRNA sequencing for the identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari*. *Journal of Nucleic Acids Investigation*, 2(1), e7–e7.
- Guo, J., Wu, S., Zhang, F., Huang, C., He, K., Babendreier, D., & Wang, Z. (2020). Prospects for microbial control of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: a review. *BioControl*, 65(6), 647–662.
- Guzmán-Prada, D., Rodríguez-Chalarca, J., & Valencia-Cataño, S. (2016). *Identificación de Estadios Larvales de Lepidópteros Plaga de Maíz*. Retrieved from [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos\\_Ciat/biblioteca/CIAT\\_IDENTIFICACION\\_DE\\_ESTADIOS\\_LARVALES\\_DE\\_LEPIDOPTEROS\\_PLAGA\\_MAIZ-v2.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/CIAT_IDENTIFICACION_DE_ESTADIOS_LARVALES_DE_LEPIDOPTEROS_PLAGA_MAIZ-v2.pdf)
- Haase, S., Sciocco-Cap, A., & Romanowski, V. (2015). Baculovirus insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives. *Viruses*, 7(5), 2230–2267.

- Hajek, A. E., Morris, E. E., & Hendry, T. A. (2019). Context dependent interactions of insects and defensive symbionts: insights from a novel system in siricid woodwasps. *Current Opinion in Insect Science*.
- Hammer, T. J., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Jaffe, S. P., & Fierer, N. (2017). Caterpillars lack a resident gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(36), 9641–9646.
- Hammer, T., McMillan, W., & Fierer, N. (2014). Metamorphosis of a butterfly-associated bacterial community. *PloS One*, *9*(1), e86995.
- Harrison, J. F. (2001). Insect acid-base physiology. *Annual Review of Entomology*, *46*(1), 221–250.
- Harrison, R., Thierfelder, C., Baudron, F., Chinwada, P., Midega, C., Schaffner, U., & van den Berg, J. (2019). Agro-ecological options for fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* JE Smith) management: providing low-cost, smallholder friendly solutions to an invasive pest. *Journal of Environmental Management*, *243*, 318–330.
- Hendry, T. A., Hunter, M. S., & Baltrus, D. A. (2014). The facultative symbiont *Rickettsia* protects an invasive whitefly against entomopathogenic *Pseudomonas syringae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, *80*(23), 7161–7168.
- Higueta Palacio, M. F., Montoya, O. I., Saldamando, C. I., García-Bonilla, E., Junca, H., Cadavid-Restrepo, G. E., & Moreno-Herrera, C. X. (2021). Dry and Rainy Seasons Significantly Alter the Gut Microbiome Composition and Reveal a Key *Enterococcus* sp. (Lactobacillales: Enterococcaceae) Core Component in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Corn Strain from Northwestern Colombia. *Journal of Insect Science*, *21*(6), 10.
- Hruska, A. J. (2019). Fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) management by smallholders. *CAB Rev*, *14*(043), 1–11.
- Huang, F., Qureshi, J., Meagher Jr, R., Reisig, D., Head, G., Andow, D., Niu, Y. (2014). Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. *PloS One*, *9*(11), e112958.
- IBM Corp. (2013). *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0*. Armonk, NY: IBM corp.
- IPPC. (2018). First detection of Fall Army Worm on the border of Thailand. Retrieved from <https://www.ippc.int/en/countries/thailand/pestreports/2018/12/first-detection-of-fall-army-worm-on-the-border-of-thailand/>
- IPPC. (2019). First Detection of Fall Armyworm in China. Retrieved June 22, 2019, from <https://www.ippc.int/en/news/first-detection-of-fall-armyworm-in-china/>

- Janson, E., Stireman, J., Singer, M., & Abbot, P. (2008). Phytophagous Insect Microbe Mutualisms and Adaptive Evolutionary Diversification. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*.
- Jaramillo-Barrios, C. I., Quijano, E. B., & Andrade, B. M. (2019). Populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) cause significant damage to genetically modified corn crops. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 72(3), 8953–8962.
- Jensen, M., Webster, J. A., & Straus, N. (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4), 945–952.
- Johnson, S. (1987). Migration and the life history strategy of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* in the Western Hemisphere. *International Journal of Tropical Insect Science*, 8(4-5-6), 543–549.
- Johnston, P., & Rolff, J. (2015). Host and symbiont jointly control gut microbiota during complete metamorphosis. *PLoS Pathogens*, 11(11), e1005246.
- Jones, A. G., Mason, C. J., Felton, G. W., & Hoover, K. (2019a). Host plant and population source drive diversity of microbial gut communities in two polyphagous insects. *Scientific Reports*, 9(1), 2792. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39163-9>
- Jones, A. G., Mason, C. J., Felton, G. W., & Hoover, K. (2019b). Host plant and population source drive diversity of microbial gut communities in two polyphagous insects. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11.
- Juárez, M., Schöfl, G., Vera, M., Vilardi, J., Murúa, M., Willink, E., Groot, A. (2014). Population structure of *Spodoptera frugiperda* maize and rice host forms in South America: are they host strains? *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 152(3), 182–199.
- Kalleshwaraswamy, C., Asokan, R., SWAMY, H., Maruthi, M., Pavithra, H., Hegde, K., Goergen, G. (2018). First report of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), an alien invasive pest on maize in India. *Pest Management in Horticultural Ecosystems*, 24(1), 23–29.
- Kikuchi, Y., Hayatsu, M., Hosokawa, T., Nagayama, A., Tago, K., & Fukatsu, T. (2012). Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(22), 8618–8622.
- Krenn, H. W. (2010). Feeding mechanisms of adult Lepidoptera: structure, function, and evolution of the mouthparts. *Annual Review of Entomology*, 55, 307.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular

- evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547.
- Lecocq, A., Natsopoulou, M., Berggreen, I., Eilenberg, J., Heckmann, L., Nielsen, H., Jensen, A. (2021). Probiotic properties of an indigenous *Pediococcus pentosaceus* strain on *Tenebrio molitor* larval growth and survival. *Journal of Insects as Food and Feed*, 7(6), 975–986.
- Levy, H. C., Garcia-Maruniak, A., & Maruniak, J. E. (2002). Strain identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) insect and cell line: PCR-RFLP of cytochrome oxidase C subunit I Gene. *Florida Entomologist*, 85(1), 186–190. Retrieved from [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2002\)085\[0186:SIOSFL\]2.0.CO](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2002)085[0186:SIOSFL]2.0.CO)
- Li-zhong, X. I., Guo-hua, L., Yong-hong, W., Li, M., & Yun-dong, L. I. (2015). *Protection Methods to Reduce Nitrogen and Phosphorus Losses from Sloping Citrus Land in the Three Gorges Area of China*. 25(3), 478–488. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)30015-1](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(15)30015-1)
- MacWilliams, M., & Liao, M. (2006). Luria broth (LB) and Luria agar (LA) media and their uses protocol. *ASM MicrobeLibrary. American Society for Microbiology*.
- Mason, C., Couture, J., & Raffa, K. F. (2014). Plant-associated bacteria degrade defense chemicals and reduce their adverse effects on an insect defoliator. *Oecologia*, 175(3), 901–910.
- McCarthy, C. B., Cabrera, N. A., & Virla, E. G. (2015). Metatranscriptomic analysis of larval guts from field-collected and laboratory-reared *Spodoptera frugiperda* from the South American subtropical region. *Genome Announc.*, 3(4), e00777-15.
- Meagher, R., Nagoshi, R., Stuhl, C., & Mitchell, E. (2004). Larval development of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on different cover crop plants. *Florida Entomologist*, 87(4), 454–460.
- Mello, D., de Freitas, A., Andrade, K., dos Santos, C., Oliveira, P., & Neves, M. C. (2017). Biology and nutrition of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) fed on different food sources. *Scientia Agricola*, 74, 18–31.
- Mereghetti, V., Chouaia, B., Limonta, L., Locatelli, D. P., & Montagna, M. (2019). Evidence for a conserved microbiota across the different developmental stages of *Plodia interpunctella*. *Insect Science*, 26(3), 466–478.
- Molina-Ochoa, J., Carpenter, J., Heinrichs, E., & Foster, J., (2003). Parasitoids and parasites of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas and Caribbean Basin: an inventory. *Florida Entomologist*, 86(3), 254–290.

- Montezano, D. G., Specht, A., Sosa-Gómez, D. R., Roque-Specht, V. F., Sousa-Silva, J. C., Paula-Moraes, S. V. de, ... Hunt, T. E. (2018). Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. *African Entomology*, 26(2), 286–301.
- Moran, N. A., McCutcheon, J. P., & Nakabachi, A. (2008). Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual Review of Genetics*, 42, 165–190.
- Morillo, F. (2001). Resistencia de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambdacihalotrina y metomil. *Entomotropica*, 16, 79–87.
- Muratoglu, H., Kati, H., Demirbag, Z., & Sezen, K. (2009). High insecticidal activity of *Leclercia adecarboxylata* isolated from *Leptinotarsa decemlineata* (Col.: Chrysomelidae). *African Journal of Biotechnology*, 8(24).
- Murúa, M., Vera, M., Abraham, S., Juárez, M., Prieto, S., Head, G., & Willink, E. (2008). Fitness and mating compatibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from different host plant species and regions in Argentina. *Annals of the Entomological Society of America*, 101(3), 639–649.
- Nagoshi, R. (2012). Improvements in the identification of strains facilitate population studies of fall armyworm subgroups. *Annals of the Entomological Society of America*, 105(2), 351–358.
- Nagoshi, R., Meagher, R., Adamczyk Jr, J., Braman, S., Brandenburg, R., & Nuessly, G. (2006). New restriction fragment length polymorphisms in the cytochrome oxidase I gene facilitate host strain identification of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) populations in the southeastern United States. *Journal of Economic Entomology*, 99(3), 671–677.
- Nagoshi, R., & Meagher, R. (2003). Fall armyworm FR sequences map to sex chromosomes and their distribution in the wild indicate limitations in interstrain mating. *Insect Molecular Biology*, 12(5), 453–458.
- Nagoshi, R., & Meagher, R. (2004a). Behavior and distribution of the two fall armyworm host strains in Florida. *Florida Entomologist*, 87(4), 440–450.
- Nagoshi, R., & Meagher, R. (2004b). Seasonal distribution of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains in agricultural and turf grass habitats. *Environmental Entomology*, 33(4), 881–889.
- Nagoshi, R., Koffi, D., Agboka, K., Tounou, K., Banerjee, R., Jurat-Fuentes, J., & Meagher, R. (2017). Comparative molecular analyses of invasive fall armyworm in Togo reveal strong similarities to populations from the eastern United States and the Greater Antilles. *PLoS One*, 12(7), e0181982.

- Navasero, M., & Navasero, M., (2020). Life cycle, morphometry and natural enemies of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) on Zea mays L. in the Philippines. *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*, 26(2), 17–29.
- Negrete-Barón, F., & Morales-Angulo, J. (2003). *El gusano cogollero del maíz Spodoptera frugiperda*. Smith (p. 25). p. 25. Corporación Técnica Corpóica, Universidad del Sinú.
- Oliveira, N. C., Rodrigues, P. A. P., & Cônsoli, F., (2021). Host-Adapted Strains of *Spodoptera frugiperda* Hold and Share a Core Microbial Community Across the Western Hemisphere. *BioRxiv*.
- Overton, K., Maino, J., Day, R., Umina, P., Bett, B., Carnovale, D., ... Reynolds, O. (2021). Global crop impacts, yield losses and action thresholds for fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*): A review. *Crop Protection*, 145, 105641.
- Paniagua, L., Frago, E., Kaltenpoth, M., Hilker, M., & Fatouros, N. (2018). Bacterial symbionts in lepidoptera: Their diversity, transmission, and impact on the host. *Frontiers in Microbiology*, 9, 556.
- Pashley, D., McMichael, M., & Silvain, J. (2004). Multilocus genetic analysis of host use, introgression, and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 97(5), 1034–1044.
- Pashley, D. (1986). Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex? *Annals of the Entomological Society of America*, 79(6), 898–904.
- Pashley, D. (1998). Sex linkage and speciation in Lepidoptera. In *Endless forms: species and speciation* (Vol. 309, p. 319). Oxford University Press New York, NY, USA.
- Pashley, D., Hammond, A., & Hardy, T. (1992). Reproductive isolating mechanisms in fall armyworm host strains (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 85(4), 400–405.
- Pashley, D., & Martin, J. (1987). Reproductive incompatibility between host strains of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 80(6), 731–733.
- Pashley, D., McMichael, M., & Silvain, J.-F. (2004). Multilocus genetic analysis of host use, introgression, and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 97(5), 1034–1044.
- Patel, M., Patel, K., Al-Keridis, L. A., Alshammari, N., Badraoui, R., Elsbali, A. M., ... Adnan, M. (2022). Cadmium-Tolerant Plant Growth-Promoting Bacteria

- Curtobacterium oceanosedimentum* Improves Growth Attributes and Strengthens Antioxidant System in Chili (*Capsicum frutescens*). *Sustainability*, 14(7), 4335.
- Porter, C., & Collins, F. (1991). Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 45(2), 271–279.
- Prasanna, B., Huesing, J., Eddy, R., & Peschke, V. (2018). *Fall armyworm in Africa: a guide for integrated pest management*.
- Prowell, D. P., McMichael, M., & Silvain, J.-F. (2004). Multilocus Genetic Analysis of Host Use, Introgression, and Speciation in Host Strains of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 97(5), 1034–1044. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2004\)097](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2004)097) [1034: MGAOHU]2.0.CO;2
- Ragland, S., & Criss, A. (2017). From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathogens*, 13(9), e1006512.
- Reay-Jones, F. P. F., Bessin, R. T., Brewer, M. J., Buntin, D. G., Catchot, A. L., Cook, D. R., ... Reisig, D. D. (2016). Impact of lepidoptera (crambidae, noctuidae, and pyralidae) pests on corn containing pyramided bt traits and a blended refuge in the Southern United States. *Journal of Economic Entomology*, 109(4), 1859–1871.
- Ríos-Díez, J. D., & Saldamando-Benjumea, C. I. (2011). Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Strains from Central Colombia to Two Insecticides, Methomyl and Lambda-Cyhalothrin: A Study of the Genetic Basis of Resistance. *Journal of Economic Entomology*, 104(5), 1698–1705. <https://doi.org/10.1603/EC11079>
- Ríos-Díez, J., Siegfried, B., & Saldamando-Benjumea, C. (2012). Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Strains from Central Colombia to Cry1Ab and Cry1Ac Entotoxins of *Bacillus thuringiensis*. *Southwestern Entomologist*, 37(3), 281–293. Retrieved from <https://doi.org/10.3958/059.037.0304>
- Rizzo, H. F. E., & La Rossa, F. R. (1992). Aspectos morfológicos y biológicos de la " oruga militar tardia"[*Spodoptera frugiperda* [JE Smith]] [Lep.: Noctuidae]. *Revista de La Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires*, 13(2–3).
- Russell, V., & Dunn, P. (1996). Antibacterial proteins in the midgut of *Manduca sexta* during metamorphosis. *Journal of Insect Physiology*, 42(1), 65–71.
- Rwomushana, I. (2019). *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm). *Invasive Species Compendium*, (29810). <https://doi.org/10.1079/ISC.29810.20203373913>



- Saldamando-Benjumea, C., Estrada-Piedrahíta, K., Velásquez-Vélez, M., & Bailey, R. (2014). Assortative mating and lack of temporality between corn and rice strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) from Central Colombia. *Journal of Insect Behavior*, 27(5), 555–566.
- Salinas-Hernandez, H., & Saldamando-Benjumea, C. (2011). Haplotype identification within *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) corn and rice strains from Colombia. *Neotropical Entomology*, 40(4), 421–430.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6), 1–18.
- Senyo, K., Wanjiru, J., Ekesi, S., Mbarak, F., Levi, O., & Subramanian, S. (2019). Ovicidal effects of entomopathogenic fungal isolates on the invasive Fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Applied Entomology*.
- Shao, Y., Arias-Cordero, E. M., & Boland, W. (2013). Identification of metabolically active bacteria in the gut of the generalist *Spodoptera littoralis* via DNA stable isotope probing using <sup>13</sup>C-glucose. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (81), e50734.
- Shao, Y., Chen, B., Sun, C., Ishida, K., Hertweck, C., & Boland, W. (2017). Symbiont-derived antimicrobials contribute to the control of the lepidopteran gut microbiota. *Cell Chemical Biology*, 24(1), 66–75.
- Sharanabasappa, Kalleshwaraswamy, C., Maruthi, M., & Pavithra, H. (2018). Biology of invasive fall army worm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) on maize. *Indian Journal of Entomology*, 80(3), 540–543.
- Shorey, H., & Hale, R. (1965). Mass-rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, 58(3), 522–524.
- Stehr, F. W. (1987). *Immature insects*. Dubuque, US: Kendall/Hunt Publishing.
- Storer, N., Babcock, J., Schlenz, M., Meade, T., Thompson, G., Bing, J., & Huckaba, R. (2010). Discovery and Characterization of Field Resistance to Bt Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *Journal of Economic Entomology*, 103(4), 1031–1038. <https://doi.org/10.1603/EC10040>
- Storer, N., Kubiszak, M., King, J., Thompson, G., & Santos, A. (2012). Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(3), 294–300.
- Stouthamer, R., Breeuwer, J., & Hurst, G. (1999). *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Reviews in Microbiology*, 53(1), 71–

102.

- Su, Q., Zhou, X., & Zhang, Y. (2013). Symbiont-mediated functions in insect hosts. *Communicative & Integrative Biology*, 6(3), e23804.
- Sudakaran, S., Salem, H., Kost, C., & Kaltenpoth, M. (2012). Geographical and ecological stability of the symbiotic mid-gut microbiota in European firebugs, *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Molecular Ecology*, 21(24), 6134–6151.
- Tabata, J., Hattori, Y., Sakamoto, H., Yukuhiro, F., Fujii, T., Kugimiya, S., Kageyama, D. (2011). Male killing and incomplete inheritance of a novel *Spiroplasma* in the moth *Ostrinia zaguliaevi*. *Microbial Ecology*, 61(2), 254–263.
- Tang, X., Freitag, D., Vogel, H., Ping, L., Shao, Y., Cordero, E. A., ... Boland, W. (2012). Complexity and variability of gut commensal microbiota in polyphagous lepidopteran larvae. *PloS One*, 7(7), e36978.
- Tepa-Yotto, G. T., Tonnang, H. E. Z., Goergen, G., Subramanian, S., Kimathi, E., Abdel-Rahman, E. M., Niassy, S. (2021). Global habitat suitability of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera, Noctuidae): key parasitoids considered for its biological control. *Insects* 12: 273. *Insects*, 12(4), 273.
- Thakur, A., Dhammi, P., Saini, H. S., & Kaur, S. (2015). Pathogenicity of bacteria isolated from gut of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) and fitness costs of insect associated with consumption of bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology*, 127, 38–46.
- Togola, A., Meseka, S., Menkir, A., Badu-Apraku, B., Boukar, O., Tamò, M., & Djouaka, R. (2018). Measurement of pesticide residues from chemical control of the invasive *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in a maize experimental field in Mokwa, Nigeria. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(5), 849.
- Ugwu, J., Liu, M., Sun, H., & Asiegbu, F. (2020). Microbiome of the larvae of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) from maize plants. *Journal of Applied Entomology*, 144(9), 764–776.
- van den Bosch, T. J. M., & Welte, C. U. (2017). Detoxifying symbionts in agriculturally important pest insects. *Microbial Biotechnology*, 10(3), 531–540.
- Vargas-Méndez, L. Y., Sanabria-Flórez, P. L., Saavedra-Reyes, L. M., Merchan-Arenas, D. R., & Kouznetsov, V. V. (2018). Bioactivity of semisynthetic eugenol derivatives against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae infesting maize in Colombia. *Saudi Journal of Biological Sciences*.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.09.010>

- Veenstra, K., Pashley, D., & Ottea, J. (1995). Host-plant adaptation in fall armyworm host strains: comparison of food consumption, utilization, and detoxication enzyme activities. *Annals of the Entomological Society of America*, 88(1), 80–91.
- Velásquez-Vélez, M. I., Saldamando-Benjumea, C. I., & Ríos-Diez, J. D. (2011). Reproductive isolation between two populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in corn and rice fields from Central Colombia. *Annals of the Entomological Society of America*, 104(4), 826–833.
- Vélez-Arango, A., Arango, R., Villanueva, D., Aguilera, E., & Saldamando, C. (2008). Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) mediante marcadores mitocondriales y nucleares. *Revista Colombiana de Entomología*, 34(2), 145–150.
- Visôto, L., Oliveira, M., Ribon, A., Mares-Guia, T., & Guedes, R. (2009). Characterization and identification of proteolytic bacteria from the gut of the velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*, 38(4), 1078–1085.
- Vivero-Gómez, R. (2016). *Characterization of the intestinal microbiota of natural populations of Lutzomyia evansi: vector of visceral Leishmaniasis*. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.
- Wang, M., Peng, Y., Huang, X., Jin, Y., Yun, Y., & Peng, Y. (2020). Incidence of Wohlbachia, cardinium, spiroplasma and Phage Wo in Different Geographical Populations of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) from China. *Entomological News*, 129(3), 230–243.
- Wang, W., He, P., Zhang, Y., Liu, T., Jing, X., & Zhang, S. (2020). The population growth of *Spodoptera frugiperda* on six cash crop species and implications for its occurrence and damage potential in China. *Insects*, 11(9), 639.
- Wang, X., Sun, S., Yang, X., Cheng, J., Wei, H., Li, Z., ... Liu, X. (2020). Variability of gut microbiota across the life cycle of *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Frontiers in Microbiology*, 1366.
- Watanabe, K., Nelson, J., Harayama, S., & Kasai, H. (2001). ICB database: the gyrB database for identification and classification of bacteria. *Nucleic Acids Research*, 29(1), 344–345.
- Weinert, L. A., Araujo-Jnr, E. V, Ahmed, M. Z., & Welch, J. J. (2015). The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1807), 20150249.

- Xia, X., Gurr, G., Vasseur, L., Zheng, D., Zhong, H., Qin, B., Li, Y. (2017). Metagenomic sequencing of diamondback moth gut microbiome unveils key holobiont adaptations for herbivory. *Frontiers in Microbiology*, 8, 663.
- Xiang, H., Wei, G.-F., Jia, S., Huang, J., Miao, X.-X., Zhou, Z., ... Huang, Y.-P. (2006). Microbial communities in the larval midgut of laboratory and field populations of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Canadian Journal of Microbiology*, 52(11), 1085–1092.
- Yamamoto, S., & Harayama, S. (1995). PCR amplification and direct sequencing of gyrB genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 1104–1109.
- Yu, S. (1991). Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 39(1), 84–91.
- Zenner de Polanía, I., Arévalo-Maldonado, H., Mejía-Cruz, R., & Díaz\_Sánchez, J. (2009). *Spodoptera frugiperda*: respuesta de distintas poblaciones a la toxina Cry1Ab. *Revista Colombiana de Entomología*, 35(1), 34–41.
- Zhang, L., Liu, B., Zheng, W., Liu, C., Zhang, D., Zhao, S., ... Jones, C. M. (2019). High-depth resequencing reveals hybrid population and insecticide resistance characteristics of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) invading China. *BioRxiv*, 813154.
- Zhang, Y., Huang, J., Zhou, B., Zhang, C., Liu, W., Miao, X., & Huang, Y. (2009). Up-regulation of lysozyme gene expression during metamorphosis and immune challenge of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 70(1), 18–29.